

Biochemische Untersuchungen
an Polysacchariden in Zellwänden
verschiedener coryneformer Bakterien
- Die strukturelle Rolle von Galaktose

Peter Nordmann

**Biochemische Untersuchungen an Polysacchariden
in Zellwänden verschiedener coryneformer
Bakterien - Die strukturelle Rolle von
Galaktose**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Peter Nordmann
aus
München

März 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Fiedler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.7.1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	10
1. Organismen und Stammhaltung	10
2. Nährmedien	12
3. Kulturbedingungen	13
4. Zellwändepräparation	14
4.1. Tryptisch verdaute Zellwände	14
4.2. Natriumdodecylsulfat-Behandlung der ZWtrp	14
5. Extraktions- und Hydrolysebedingungen	15
5.1. Extraktion von Polysacchariden aus der ZWtrp, SDS mit Formamid	15
5.2. Extraktion mit Trichloressigsäure	15
5.3. Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure	16
5.4. Salzsäurehydrolysen	16
5.4.1. Totalhydrolyse - zur Freisetzung von Aminosäuren und Aminosackern	16
5.4.2. Hydrolyse von Glykosiden	16
5.4.3. Bestimmung der Hydrolyseraten	17
6. Enzymatische Behandlungen der Zellwände und der extrahierten Polysaccharide	17
6.1. Behandlung der Zellwände mit Mutanolysin	17
6.2. Alkalische Phosphatase	17
6.3. Exo- β -Galaktofuranosidase	18
6.4. Glykohydrolasen	18
7. Chromatographische Methoden	19
7.1. Flüssigchromatographie	19
7.1.1. Gelfiltration	19
7.1.2. Ionenaustauschchromatographie	20
7.2. Gaschromatographie	20
7.2.1. Derivatisierung	20

	Seite:
7.2.2. Gaschromatographische Bedingungen	21
7.3. Dünnschicht-Chromatographie	22
7.4. Dünnschicht-Elektrophorese	22
7.5. Aminosäurenanalysator	22
8. Perjodat-Oxidation	24
8.1. Glykolspaltung durch Smith-Abbau	24
8.2. Glykolspaltung und Formaldehyd-Bestimmung	25
9. Analytische Nachweise	25
9.1. Bestimmung von Galaktose	25
9.2. Bestimmung von Glucose	26
9.3. Bestimmung von Glycerin	26
9.4. Bestimmung von Neutralzuckern	26
9.5. Bestimmung von Phosphat	26
9.6. Morgan-Elson-Test	27
9.7. Sulfat-Bestimmung mit Benzidin	27
9.8. Sulfat-Bestimmung mit Rhodizonat	28
9.9. Ribit-Bestimmung	28
9.10. Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenz	29
9.11. Schwefelsäure-Sprühreagenz	29
10. Verschiedene Methoden	29
10.1. Gewinnung von Galaktomannan	29
10.2. Präparation von Peptidophosphogalaktomannan	30
10.3. Gewinnung von exo- β -Galaktofuranosidase	32
10.4. Dialysen	33

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchung von akzessorischen Zellwandpolymeren ausgewählter coryneformer Bakterien	35
1.1. Chemische Zusammensetzung der ZWtrp, SDS und der SDS-Extrakte von A.aureus, A.histidinovorans, A.ureafaciens, B.insectiphilum und C.ilicis	35
1.2. Inkubation der Zellwände von A.aureus mit Mutanolysin	37
1.3. Versuche zur Extraktion der akzessorischen Polysaccharide	37

1.3.1. Gegenüberstellung der verschiedenen Extraktionsmethoden	39
1.4. Flüssigchromatographie der extrahierten Polysaccharide	40
1.4.1. Chromatographie an Ionenaustauschern	40
1.4.2. Chromatographie an Sephacryl S-300 sf	41
1.5. Hydrolyselabilität der extrahierten Polysaccharide	42
1.5.1. Bestimmung der Hydrolyselabilität	44
1.5.2. Hydrolyselabilität der Galaktane gegenüber 60% HF	46
1.6. Perjodat-Oxidation der Polysaccharide	47
1.6.1. Perjodat-Oxidation und Formaldehyd-Bestimmung	47
1.6.2. Smith-Abbau der Polysaccharide	49
1.7. Enzymatische Untersuchungen zur Struktur der Galaktane	51
1.7.1. Enzymatische Hydrolyse von Galaktose durch exo- β -Galaktofuranosidase	51
1.7.2. Reaktion von D-Galaktose-Oxidase mit den Galaktanen	53
1.8. Isolierung und Charakterisierung von Oligosacchariden der partiell hydrolysierten Galaktane	54
1.8.1. Hydrolyse mit HF	54
1.9. Untersuchung des partiell hydrolysierten <i>A. aurescens</i> -Galaktans	56
1.9.1. Gelfiltration des Partialhydrolysats	56
1.9.2. Größenordnung der erhaltenen Bruchstücke	58
1.10. Charakterisierung der Oligosaccharide des <i>A. aurescens</i> -Galaktans	59
1.10.1. Hydrolyselabilität des Oligosaccharids B	59
1.10.1.1. Enzymatische Hydrolyse des Oligosaccharids B	61
1.10.2. Oligosaccharid B ₂ des <i>A. aurescens</i> -Galaktans	61

	Seite:
1.10.2.1. Enzymatische Oxidation	61
1.10.2.2. Smith-Abbau	61
1.10.2.3. Abbau durch Glykohydrolasen	62
1.10.2.4. Strukturvorschlag	62
1.10.3. Oligosaccharid C des A.aurescens-Galaktans	62
1.10.3.1. Enzymatische Oxidation	62
1.10.3.2. Smith Abbau	62
1.10.3.3. Strukturvorschlag	63
1.10.4. Oligosaccharid A des A.aurescens-Galaktans	63
1.10.5. Oligosaccharid E des A.aurescens-Galaktans	65
1.11. Gelfiltration der partiell hydrolysierten Galak- tane von A.ureafaciens, A.histidinolovorans, B.in- sectiphilum und C.ilicis	65
1.11.1 Gegenüberstellung der Oligosaccharide B	67
1.12. Reaktion des A.aurescens-Galaktans mit einem Anti- LsG-Serum	67
1.13. Struktureller Aufbau der Galaktane	68
2. Untersuchungen zur Bindungsart von Galaktose in den akzessorischen Zellwandpolymeren von A.globiformis, A.oxydans, C.murisepticum, A.polychromogenes und Arthrobacter sp. DSM 20125	69
2.1. Chemische Zusammensetzung der akzessorischen Zell- wandpolysaccharide	69
2.2. Extraktion der akzessorischen Zellwandpolysaccharide	70
2.3. Gelfiltration der Polysaccharide mit Sephacryl S-300	70
2.4. Hydrolyselabilität der extrahierten Polysaccharide	72
2.5. Perjodat-Oxidation der bakteriellen Polysaccharide	74
2.5.1. Perjodat-Oxidation und Formaldehyd-Bestimmung	74
2.5.2. Smith-Abbau der Polysaccharide	75
2.6. Charakterisierung der bakteriellen Zellwandpolysac- charide	75
2.7. Enzymatische Hydrolyse von Galaktose durch exo- β - Galaktofuranosidase	78

	Seite:
3. Untersuchung der akzessorischen Zellwandpolymere von <i>Rothia dentocariosa</i> NCTC 10917, <i>Rothia dentocariosa</i> NCTC 10207 und Vergleich mit den Galaktanen der <i>Arthrobacter</i> -Vertreter	78
3.1. Chemische Zusammensetzung der Zellwände	78
3.2. Extraktion der Zellwandpolysaccharide	79
3.3. Gelfiltration der Polysaccharide mit Sephacryl S-300	80
3.4. Hydrolyselabilität der glykosidischen Bindung von Galaktose in den Polysacchariden	80
3.5. Smith-Abbau der extrahierten Polysaccharide	81
4. Untersuchung des Aufbaus und der glykosidischen Bindung von Galaktose der akzessorischen Zellwandpolymere von <i>Brevibacterium casei</i> und <i>Brevibacterium epidermidis</i>	82
4.1. Chemische Zusammensetzung der Zellwände	82
4.2. Extraktion der Zellwandpolysaccharide	83
4.3. Chromatographie der TCA-Extrakte an DEAE-Sephacel	84
4.4. Gelfiltration der TCA-Extrakte nach HF-Hydrolyse mit Bio-Gel P-2	84
4.4.1. Untersuchung der Spaltprodukte von <i>B. casei</i>	84
4.4.2. Untersuchung der Spaltprodukte von <i>B. epidermidis</i>	86
4.5. Mol-Verhältnisse der einzelnen Komponenten der Polysaccharide	88
5. Untersuchung der Galaktose enthaltenden akzessorischen Zellwandpolysaccharide von <i>Pimelobacter simplex</i> DSM 20130 und <i>Pimelobacter simplex</i> NCIB 9770	90
5.1. Zellwändepräparation	90
5.2. Chemische Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide	90
5.3. Extraktion des Zellwandpolysaccharids von <i>P. simplex</i> DSM 20130	90
5.4. Chromatographische Untersuchungen des Formamidextrakts	92
5.4.1. Chromatographie an DEAE-Sephacel	92
5.4.2. Gelfiltration mit Sephacryl S-300 sf	93

Seite:

5.4.3. Dünnschicht-Chromatographie	95
5.4.4. Dünnschicht-Elektrophorese	96
5.5. Inkubation des Formamidextrakts mit alkalischer Phosphatase	96
5.6. Säurehydrolyselabilität der Galaktose des Polysac- charids	97
IV. DISKUSSION	99
V. ZUSAMMENFASSUNG	114
VI. LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGEN

A.	Arthrobacter
Ala	Alanin
Ara	Arabinose
B.	Brevibacterium
BHI	Brain-Heart-Infusion
C.	Corynebacterium
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DeT	6-Desoxy-Talose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dpm	Diaminopimelinsäure
Ert	Erythrit
Fru	Fructose
Gal	Galaktose
Gal _f	Galaktofuranose
Gal _p	Galaktopyranose
GalN	Galaktosamin
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gro	Glycerin
h	Stunde
HD	Hefe-Dextrose
HF	Fluorwasserstoff
Lys	Lysin
M	molar
Man	Mannose
Man(OH)	Mannit
ManN	Mannosamin
ManNAc	N-Acetyl-Mannosamin

m-Dpm	meso-Diaminopimelinsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
O.D.	optische Dichte
P.	Pimelobacter
P _i	anorganisches Phosphat
R.	Rothia
Rham	Rhamnose
Rit	Ribit
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	species
TCA	Trichloressigsäure
Thr	Threonin
Tht	Threit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten der Enzymaktivität
UDP	Uridin-5'-diphosphat
ZW	Zellwand
ZWtrp	tryptisch verdaute Zellwand
ZWtrp, SDS	tryptisch verdaute, SDS behandelte Zellwand

I. EINLEITUNG

Ein gemeinsames Merkmal aller Zellen ist, daß sie von einer Kohlenhydrat-reichen Hülle umgeben sind. Diese Oberflächen-schicht besteht bei eukaryontischen Zellen aus Glykolipiden, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Bei Eubakterien haben, im Gegensatz zu Archaeobakterien (Wieland et al., 1982), Glykoproteine und Glykolipide einen relativ geringen Anteil am Aufbau der Zellhülle. Auf eubakteriellen Oberflächen finden sich, in verschiedener Weise gebunden, hauptsächlich Polysaccharide.

Auch das Grundgerüst der eubakteriellen Zellwände, das Murein oder Peptidoglykan, weist einen Kohlenhydratanteil auf. Es besteht aus linearen Polysaccharidketten von β -(1 $\rightarrow$ 4) verknüpftem N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure. Diese Polysaccharidketten sind durch besonders aufgebaute kurze Peptidketten miteinander quervernetzt, so daß der sogenannte Mureinsacculus entsteht. Dieser bedingt die Form und die mechanische Festigkeit der eubakteriellen Zelle.

Durch die Gram-Färbung sind Eubakterien in Gram-positive und Gram-negative zu unterscheiden. Das Murein macht bei Gram-negativen Bakterien 10-20%, bei Gram-positiven ungefähr 50% des Zellwandgewichts aus. Den übrigen Anteil bilden akzessorische Zellwandpolymere, die entweder kovalent mit dem Murein verknüpft sind oder über inter- bzw. intramolekulare Wechselwirkungen in der bakteriellen Zellhülle verankert sind. Diese akzessorischen Zellwandpolymere variieren zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, aber auch innerhalb dieser beiden Bakteriengruppen (Schleifer und Kandler, 1972).

Bei Gram-negativen Bakterien wie z.B. Escherichia coli ist ein Teil des in der Zelle vorkommenden Lipoproteins kovalent mit dem Murein verbunden. Dieses Lipoprotein stellt eine Verbindung

des Mureins mit der Äußeren Membran her, welche die Mureinschicht überlagert. Sie besitzt, neben Phospholipiden und Proteinen, als spezifische Komponente das Lipopolysaccharid, das mit seinem Lipidteil, dem Lipid A, über hydrophobe Wechselwirkungen in der Äußeren Membran verankert ist. An das Lipid A ist ein Oligosaccharid, die sogenannte Kernzone, kovalent gebunden, die wiederum mit einem Polysaccharid, der O-spezifischen Seitenkette, kovalent verknüpft ist (Braun und Rehn, 1968; Hammond et al., 1984).

Polysaccharide kommen weiterhin in Bakterien, entweder an das Murein kovalent gebunden, als sogenannte Zellwandpolysaccharide, oder extrazellulär vor. Im letzteren Fall handelt es sich um Kapseln oder Schleime.

Bei den Zellwandpolysacchariden Gram-positiver Bakterien unterscheidet man zwischen geladenen und neutralen Polysacchariden. Die geladenen Polysaccharide sind in der Regel Polymere mit negativen Gruppen, meist Phosphodiestergruppen. Diese Polymere wurden 1958 entdeckt und als Teichonsäuren bezeichnet (Armstrong et al., 1958). Sie enthalten neben Phosphodiestergruppen, Zuckeralkohole (Polyole) und/oder Zuckerreste sowie esterartig gebundenes D-Alanin. Teichonsäuren sind über eine Phosphodiesterbindung an das C₆-Kohlenstoffatom der N-Acetyl-Muraminsäurereste des Mureins gebunden (Baddiley, 1970; Strominger und Ghuyssen, 1963; Ward, 1981). Desweiteren kann eine andere Gruppe saurer Zellwandpolysaccharide bei Gram-positiven Bakterien vorkommen, die Teichuronsäuren. Sie weisen kurze kettenbildende Einheiten bestehend aus einer Hexose oder einem N-Acetyl-Aminozucker und einer Hexuronsäure auf. Ihre Bindung ans Murein erfolgt wie bei den Teichonsäuren über eine Phosphodiesterbindung an die N-Acetyl-Muraminsäure (Perkins, 1963; Hughes, 1970).

Neben den kovalent an das Murein gebundenen Zellwandpolysacchariden können in der Zellhülle Gram-positiver Bakterien noch weitere Kohlenhydrat-haltige Polymere vorhanden sein.

Lipoteichonsäuren und Lipomannan sind amphiphile Polymere, die mit ihrem Lipidteil, einem Glykolipid, über hydrophobe Wechselwirkungen in der Cytoplasmamembran gebunden sind und in die Zellwand hineinragen (Wicken und Knox, 1970; Powell et al., 1975). Die hydrophile Kette der Lipoteichonsäuren ist, bis auf eine geringere Strukturvariabilität, ähnlich zusammengesetzt wie Zellwandteichonsäuren. Lipoteichonsäuren unterscheiden sich aber strukturell durch ihre Lokalisation in der Zelle und durch ihre andersartige Biosynthese von Zellwandteichonsäuren (Ward, 1981; Ganfield und Pieringer, 1980).

Bakterielle Polysaccharide sind sowohl für den Organismus als auch für die Interaktion der Zelle mit der Umgebung von Bedeutung. Obwohl sicher nicht alle biologischen Funktionen der akzessorischen Zellwandpolymere bekannt sind, weiß man z.B., daß Teichonsäuren durch ihre negative Ladungsdichte an der Zelloberfläche für die Bindung von Aminoglykosid-Antibiotika (Kusser et al., 1985) und Kationen wie Magnesium (Lambert et al., 1975) sorgen. Auf der anderen Seite können Teichonsäuren offenbar durch ihren strukturellen Aufbau eine Phosphatreserve für die Zelle darstellen (Grant, 1979). Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren können auch an der Regulation autolytischer Enzyme der Zelle beteiligt sein (Höltje und Tomasz, 1975). Neben diesen Funktionen kommt Zellwandpolysacchariden ebenso wie Kapselpolysacchariden eine Bedeutung bei der Wirtsabwehr zu.

In ihren biologischen Eigenschaften sind sich Teichonsäuren und andere Oberflächenkomponenten wie Kapsel- und Zellwandpolysaccharide sehr ähnlich. Sie stellen Rezeptoren für Bakteriophagen dar (Young, 1967) und sind für die immunologischen Eigenschaften der bakteriellen Zelle verantwortlich. In ihren biologischen Eigenschaften sind Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren ebenfalls vergleichbar. Jedoch sind Lipoteichonsäuren nicht pyrogen und endotoxisch.

Um die biologischen Funktionen und Eigenschaften der unter-

schiedlichen akzessorischen Polymere verstehen zu können, ist es wichtig deren Zusammensetzung und Struktur zu kennen. Bei der Suche nach Polysacchariden mit immunstimulierender- und Antitumorwirkung, die besonders in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat, ist die strukturelle Betrachtung von besonderem Interesse (Sugawara und Ishizaka, 1984).

Der Aufbau und die biologische Bedeutung der Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien ist intensiv untersucht worden (Hammond et al., 1985). Bei den akzessorischen Zellwandpolysacchariden Gram-positiver Bakterien sind eine Vielzahl verschiedener Teichonsäurestrukturen bekannt. Dabei besteht sowohl in der Zusammensetzung als auch im Kettenaufbau eine große Variabilität. Als kettenbildende Einheiten wurden verschiedene Polyolphosphate nachgewiesen. Neben Glycerin- und Ribitphosphat (Archibald et al., 1968) treten bei einigen coryneformen Bakterien Mannit- (Anderton und Wilkinson, 1980; Fiedler et al., 1981) und Erythritphosphat (Fiedler, unveröffentlicht) auf. Auch in der Substitution dieser Polyolphosphate besteht eine bemerkenswerte Strukturvielfalt. Dabei können sowohl monomere Zucker und Aminosucker, wie z.B. α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)-Gro und α -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-Gro bei Brevibacterium linens ATCC 9172 (Fiedler et al., 1981), als auch Disaccharide, wie bei Bacillus coagulans NRS T2007 (Forrester und Wicken, 1966) auftreten. Mono- und Disaccharide können ebenso als integraler Bestandteil der Teichonsäurekette vorkommen (Burger und Glaser, 1966).

Es gibt weiterhin Beispiele für das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener Teichonsäuretypen in einem Organismus. Dabei können sich die Teichonsäureketten im strukturellen Aufbau oder nur in der Substitution unterscheiden (Fiedler et al., 1981).

Die Anbindung der Teichonsäuren an das Murein erfolgt kovalent über eine sogenannte "linkage unit", deren oligomere Struktur und Zusammensetzung bei den einzelnen Bakterien variieren kann (Kaya et al., 1984).

Die Zellwände vieler Gram-positiver Bakterien enthalten kovalent gebundene, neutrale Polysaccharide. In vielen Fällen ist die Kohlenhydratzusammensetzung dieser Polysaccharide bekannt. Die strukturellen Untersuchungen der Zellwandpolysaccharide beschränken sich aber nur auf wenige Organismen der Gattungen Streptococcus, und Lactobacillus sowie auf pathogene Vertreter der Gattungen Corynebacterium, Nocardia und Mycobacterium.

Bei der serologischen Klassifizierung der Streptokokken spielen diese Zellwandpolysaccharide, mit Ausnahme der Gruppe D und N Streptokokken, eine entscheidende Rolle (Lancefield, 1941). Gruppe A und Gruppe A-Variante Streptokokken besitzen als gruppenspezifisches Kohlenhydrat-Hapten (1→3) gebundene Rhamnose und N-Acetyl-Glucosamin (Krause und McCarty, 1961). Das Zellwandpolysaccharid der Streptokokken der Gruppe C ähnelt jenem der Gruppe A, N-Acetyl-Glucosamin ist jedoch ersetzt durch N-Acetyl-Galaktosamin (Krause und McCarty, 1962). Das Zellwandpolysaccharid von Lactobacillus casei var. rhamosus ist, als Beispiel für die Gruppe C Lactobacillen, aus Rhamnose, Glucose und Galaktose aufgebaut. Außerdem gibt es bei Lactobacillus casei Hinweise, daß das neutrale Polysaccharid wie bei den Teichonsäuren und Teichuronsäuren mit seinem reduzierenden Ende über eine Phosphodiesterbindung an das Murein verknüpft ist. Dabei befindet sich am reduzierenden Kettenende ein N-Acetyl-Galaktosamin-Rest (Knox und Hall, 1965). Die Zellwände der Mykobakterien enthalten als akzessorisches Polymer ein Glykolipid, das sich aus einem Arabinogalaktan und Mycolsäuren zusammensetzt (Cummins, 1962). Mycolsäuren sind langkettige, α -verzweigte, β -Hydroxy-Fettsäuren von 30 bis 90 C-Atomen, die in unterschiedlicher Weise ungesättigt und substituiert sein können. Sie sind über Esterbindungen an das Arabinogalaktan gebunden. Das Arabinogalaktan ist aus D-Arabinose und D-Galaktose im Verhältnis von etwa 5:2 zusammengesetzt. Es ist aus kurzen alternierenden Ketten entweder β -(1→4) gebundener Galaktopyranose oder (1→5) gebundener Galaktofuranose und α -(1→5)- und α -(1→2) ver-

knüpfter Arabinofuranose aufgebaut, die durch nicht-reduzierende Arabinoseketten verzweigt sind. Die Mureinanbindung des Arabinogalaktans erfolgt wahrscheinlich über Arabinose und eine Phosphat-Gruppe an die Muraminsäure. Bei der von Misaki et al. (1974) vorgeschlagenen Struktur des Arabinogalaktans ist allerdings unklar, ob die gebundene Galaktose als Galaktopyranose oder als Galaktofuranose vorliegt, was auch eine Änderung der glykosidischen Bindung der Galaktose zur Folge hätte.

An diesen Beispielen wird deutlich, daß die qualitative und quantitative Angabe der Zuckerzusammensetzung keinen Aussagewert für den strukturellen Aufbau der Polysaccharide hat. Für die Struktur sind die Art der vorliegenden Monosaccharidreste sowie Position und Typ ihrer Verknüpfung entscheidend. Der strukturelle Aufbau der Polysaccharide ist bei den einzelnen Bakterien genetisch festgelegt und kann deshalb zur taxonomischen Beurteilung der Bakterien herangezogen werden. Das Arabinogalaktan hat gezeigt, daß Galaktose in glykosidischer Bindung als Galaktopyranose oder Galaktofuranose vorkommen kann. Dies relativiert die Angabe von Galaktose als Zellwandzucker in besonderem Maße, da zur Biosynthese eines Galaktofuranose enthaltenden Polysaccharids im Vergleich zu einem aus Galaktopyranose aufgebautem Polysaccharid zusätzliche Enzyme genetisch codiert sein müssen (Fobes und Gander, 1972).

Ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen von Galaktofuranose in einem Zellwandpolysaccharid liegt bei Renibacterium salmoninarum vor (Kusser und Fiedler, 1983; Fiedler und Draxl, 1986). Nachgewiesen wurde Galaktofuranose bei Bifidobacterium bifidum spp. pennsylvanicum als Komponente von Glykolipiden und Lipoteichonsäure (Op den Camp et al., 1984). Galaktofuranose kommt bei Eubakterien desweiteren in dem Lipopolysaccharid von Salmonella friedenaui T1 (Berst et al., 1971), in den Kapselpolysacchariden verschiedener Klebsiella- und "Pneumococcus"-Serotypen (Joseleau et al.,

1978; Venkata Roa et al., 1969; Batavyal und Roy, 1983), bei den Pilzen in den exozellulären Polysacchariden verschiedener Penicillium Arten (Preston et al., 1970; Matsunaga et al., 1981) und in den Zellwänden von Aspergillus niger und Rhodotorula glutinis (Bardalaye und Nordin, 1977; Lee et al., 1981) vor.

Nachdem Galaktose nicht nur im Arabinogalaktan der Mykobakterien, sondern in einer Vielzahl von Zellwänden coryneformer Bakterien vorhanden ist (Cummins und Harris, 1959; Keddle und Cure, 1977; Collins et al., 1983; Fiedler, unveröffentlicht), soll in der vorliegenden Arbeit die strukturelle Rolle von Galaktose in Zellwandpolysacchariden ausgewählter coryneformer Bakterien näher untersucht werden, um den taxonomischen Wert von Galaktose in diesen Polysacchariden zu beurteilen.

Die "Gruppe coryneformer Bakterien" ist in der 8. Auflage des Bergey's Manual of Determinative Bacteriology nicht mehr als Familie definiert worden. Sie umfaßt die Gattungen Corynebacterium, Arthrobacter, Cellulomonas und Kurthia. Die Gattungen Brevibacterium und Microbacterium werden als "genera incertae sedis" in den Verwandtschaftsbereich der Gattung Arthrobacter gestellt (Rogosa et al., 1974; Keddle, 1974).

Neuere Untersuchungen haben zu einer eigenständigen Stellung der Gattung Brevibacterium innerhalb der coryneformen Bakterien geführt. Sie umfaßt vier Arten, B.linens, B.iodinum, B.casei und B.epidermidis. Für B.linens, den Typstamm, und B.iodinum sind Teichonsäuren als akzessorische Zellwandwandpolymere beschrieben worden (Collins et al., 1983; Fiedler et al., 1981; Anderton und Wilkinson, 1980). Gleichzeitig wurde von Fiedler et al. (1981) das Vorkommen von Teichonsäuren als taxonomischer Marker für Organismen der Gattung Brevibacterium gefordert. Sowohl für B.casei als auch für B.epidermidis ist von Collins et al. (1983) Galaktose als Zellwandzucker nachgewiesen worden. Die Au-

toren machen aber keine Aussage über die Art und den Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere. Aus diesem Grund wurden die beiden Organismen in die vorliegende Untersuchung aufgenommen.

Die Gattung Arthrobacter wird aus einer Vielzahl von Arten gebildet, die sich in zwei Gruppen gliedern lassen. Eine Gruppe bilden die sogenannten legitimen Vertreter der Gattung Arthrobacter. Dies sind jene, die dem Phänotyp des Typstamms A.globiformis DSM 20124 entsprechen (Keddie und Cure, 1977) und einen Basengehalt der DNA von 58-65 Mol% G+C besitzen (Yamada und Komagata, 1972). Von Stämmen dieser "globiformis Gruppe" ist bisher ausschließlich die qualitative chemische Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolymere untersucht worden. Auffallend ist, daß sie Galaktose als gemeinsame Zuckerkomponente in den Zellwänden besitzen (Cummins und Harris, 1959; Keddie und Cure, 1977; Fiedler, unveröffentlicht). Deshalb sollen von ausgewählten Organismen dieser Gruppe die akzessorischen Zellwandpolymere untersucht werden.

Einen höheren Basengehalt der DNA (65-69 Mol% G+C) und Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere hat die zweite Gruppe der Gattung Arthrobacter, die "nicotianae Gruppe" (Fiedler und Schäffler, 1987).

Eine neue Gattung innerhalb der coryneformen Bakterien stellt die Gattung Pimelobacter dar. Sie besteht aus drei Arten, P. simplex als Typstamm und P.tumescens, die vorher als "Arthrobacter simplex" und "Arthrobacter tumescens" bezeichnet worden waren, sowie P.jensenii (Suzuki und Komagata, 1983). Der Typstamm P.simplex soll in die Untersuchung der Galaktose enthaltenden akzessorischen Zellwandpolymere mitaufgenommen werden, um eventuell zu zeigen, inwieweit sich die Neubeschreibung von P.simplex DSM 20130, verglichen mit Vertretern der Gattung Arthrobacter, in der Zusammensetzung und im Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere ausdrückt.

Die akzessorischen Zellwandpolymere zweier Rothia dentocariosa Stämme sollen analysiert werden, da Collins et al. (1984) eine Verwandtschaft der Gattung Rothia mit den coryneformen Bakterien vorgeschlagen haben und über die Zusammensetzung der Zellwandzucker Unklarheit besteht (Georg und Brown, 1967; Hammond, 1970 a).

Die Gattung Rothia wurde von Georg und Brown (1967) aus Organismen, die vorher als "Nocardia salivae" und "Nocardia dentocariosus" beschrieben wurden, neu geschaffen. Sie besteht aus einer Art, R.dentocariosa. In der 8. Auflage des "Bergey's Manual" ist die Gattung Rothia in die Familie Actinomycetaceae eingegliedert worden (Slack, 1974).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen und Stammhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und ihre Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Stämme der Gattungen Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium und Pimelobacter wurden auf Hefe-Dextrose-Schrägagarröhrchen kultiviert, Rothia dentocariosa auf Agarplatten mit Brain-Heart-Infusion-Medium. Penicillium charlesii wurde durch Ausplattieren eines Milliliters einer gut gewachsenen flüssigen Kultur auf Agarplatten mit Czapek-Dox-Medium angezogen, Aspergillus niger in gleicher Weise auf Agarplatten mit Malzextrakt-Medium.

Die bewachsenen Schrägagarröhrchen und Agarplatten wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert und alle 2 Monate überimpft. Die Reinheit der Stämme wurde durch Verdünnungsausstriche und mittels eines Phasenkontrastmikroskops kontrolliert.

Tabelle 1: Verwendete Organismen und deren Herkunft

Organismus	Herkunft*	Stamm-Nr.
<i>Arthrobacter aurescens</i>	DSM	20116
<i>Arthrobacter histidinolovorans</i>	DSM	20115
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	DSM	20126
<i>Arthrobacter oxydans</i>	DSM	20119
<i>Arthrobacter oxydans</i>	DSM	20120
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	DSM	20136
<i>Arthrobacter</i> sp.	DSM	20125
<i>Arthrobacter globiformis</i>	DSM	20124
<i>Pimelobacter simplex</i>	DSM	20130
<i>Pimelobacter simplex</i>	NCIB	9770
<i>Corynebacterium ilicis</i>	DSM	20138
<i>Corynebacterium murisepticum</i>	ATCC	21374
<i>Brevibacterium insectiphilum</i>	ATCC	21686
<i>Brevibacterium casei</i>	NCDO	2048
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	NCDO	2286
<i>Rothia dentocariosa</i>	NCTC	10207
<i>Rothia dentocariosa</i>	NCTC	10917
<i>Penicillium charlesii</i>	ATCC	8730
<i>Aspergillus niger</i>	NRRL	326

- * ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
 DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
 NCIB, National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Schottland
 NCDO, National Collection of Dairy Organisms, Reading, England
 NCTC, National Collection of Type Cultures, London, England
 NRRL, Northern Utilization Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA.

2. Nährmedien

Hefe-Dextrose-Medium (HD-Medium)

Zusammensetzung:

0.5% Glucose

0.5% Hefeextrakt (Oxoid)

1.0% Pepton aus Casein (Trypton, Oxoid)

0.5% Natriumchlorid

in Aqua deion., vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit konz. Natronlauge auf pH 7.3 eingestellt.

Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI-Medium, Difco)

nach Angaben des Herstellers angefertigt.

Czapek-Dox-Medium (Clutterbuck et al., 1932)

Zusammensetzung:

3.0 g Natriumnitrat

0.5 g Magnesiumsulfat

0.5 g Kaliumchlorid

0.01g Eisen(II)sulfat

1.0 g Dikaliumhydrogenphosphat

50.0 g Saccharose

in 1l Aqua deion., pH 7.3

Raulin-Thom-Medium (Clutterbuck et al., 1932)

Zusammensetzung:

4.0 g Weinsäure

4.0 g Ammoniumtartrat

0.6 g Ammoniumphosphat

0.6 g Kaliumcarbonat

0.4 g Magnesiumcarbonat

0.25g Ammoniumsulfat

0.07g Zinksulfat

0.07g Eisen(II)sulfat
75.0 g Glucose
in 1.5l Aqua deion., pH 3.9

Malzextrakt-Medium (Bardalaye und Nordin, 1977)

Zusammensetzung:

2.0% Glucose
2.0% Malzextrakt (Merck)
0.1% Pepton aus Casein (Trypton, Oxoid)
in Aqua deion., pH 7.3.

Durch Zusatz von 1.2% Agar (Oxoid) wurden die Medien verfestigt.

3. Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Organismen erfolgte unter Schütteln in watteverschlossenen Erlenmeyerkolben (300ml Medium in 1l Kolben, 1.5l Medium in 5l Kolben) bei definierten Temperaturen. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Trübungsmessung bei 578nm verfolgt und am Ende der logarithmischen Phase durch Zugabe von Eis unterbrochen. Die Zellen wurden in einer Zentrifuge (WKF,G50K) bei 14000xg geerntet, einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und erneut sedimentiert. Die Stämme der Gattungen Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium und Pimelobacter wurden in HD-Medium bei 30°C, Rothia dentocariosa in BHI-Medium bei 37°C angezogen.

Penicillium charlesii wurde zunächst als Vorkultur (30ml) in Czapek-Dox-Medium bei 26°C kultiviert und anschließend in einen watteverschlossenen 5l Erlenmeyerkolben mit 1.5l Raulin-Thom-Medium überführt und bei 26°C geschüttelt. Das Mycel wurde durch Filtration (Schleicher und Schüll) gewonnen. Aspergillus niger wurde in 1l Erlenmeyerkolben mit 300ml Malzextrakt-Medium durch schwaches Schütteln bei 26°C kultiviert.

4. Zellwändepräparation

4.1. Tryptisch verdaute Zellwände (Schleifer und Kandler, 1967)

Die feuchten Zellen wurden nach Bestimmung des Zellgewichts mit Glasperlen (0.3mm, Braun) vermischt und in einer Zelmühle (Bühler) unter Wasserkühlung innerhalb von 10 bis 20 min aufgeschlossen.

Falls nach einer mikroskopischen Kontrolle keine intakten Zellen mehr festzustellen waren, wurden die aufgebrochenen Zellen mittels einer Glasfritte (G-1, Schott) von den Glasperlen abgetrennt und durch Sedimentation bei 48000xg (Sorvall, RC 5B) gewonnen.

Diese Rohzellwände wurden in 0.05M Phosphatpuffer, pH 7.8, aufgenommen und zur Inaktivierung autolytischer Enzyme 15 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen der Suspension erfolgte eine Zugabe von 0.5mg Trypsin/ml (Merck) und einiger Tropfen Toluol zur Verhinderung von Bakterienwachstum. Diese tryptische Verdauung wurde in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C fortgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz 20min bei 48000xg zentrifugiert. Die sedimentierten Zellwände wurden viermal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und gefriergetrocknet (ZWtrp).

Bezogen auf das Gewicht der feuchten Zellen betrug die Ausbeute 1-3%.

4.2. Natriumdodecylsulfat-Behandlung der ZWtrp (Braun und Rehn, 1968)

In eine 8% (w/v) Natriumdodecylsulfat Lösung (SDS), die zum Sieden erhitzt wurde, wurde unter gleichzeitigem Rühren tropfenweise ein gleiches Volumen einer wässrigen Suspension von ZWtrp (4mg ZWtrp/ml) zugegeben.

Diese Suspension wurde unter Rühren noch 30min am Sieden gehalten. Nach erfolgter Abkühlung wurden die Zellwände bei

48000xg sedimentiert. Der SDS-haltige Überstand wurde ausgiebig gegen Aqua deion. dialysiert und gefriergetrocknet (SDS-Extrakt).

Die Zellwände wurden zur Entfernung des SDS fünfmal mit Aqua deion. gewaschen, zentrifugiert (48000xg, 20min) und anschließend gefriergetrocknet (ZWtrp,SDS).

5. Extraktions- und Hydrolysebedingungen

5.1. Extraktion von Polysacchariden aus der ZWtrp,SDS mit Formamid (Fuller, 1938; Perkins, 1965)

ZWtrp,SDS wurde in Formamid (10mg/ml) aufgenommen, in einem Ultraschallbad (Bransonic 32) suspendiert und im Ölbad 20 min auf 150-160°C erhitzt. Zur Gewinnung der Zellwände wurde bei 48000xg zentrifugiert. Falls der Zentrifugationsüberstand nicht völlig klar war, wurde nochmals sedimentiert. Der klare Überstand wurde ausgiebig gegen Aqua deion. dialysiert und gefriergetrocknet (Formamidextrakt).

Zur Kontrolle wurde von einem Aliquot jeder Präparation eine Totalhydrolyse (5.4.1.) angefertigt und mit Hilfe eines Aminosäureanalysators auf Bestandteile des Mureins untersucht.

5.2. Extraktion mit Trichloressigsäure (Archibald et al., 1968)

ZWtrp oder ZWtrp,SDS wurden in 5% (w/v) Trichloressigsäure (10mg/ml) 24h bei 4°C gerührt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (48000xg, 20min) und der Überstand abgenommen. In dem Überstand gelöste Polymere wurden mit 4 Volumen 96% Äthanol präzipitiert. Zur vollständigen Ausbildung des Niederschlags wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach vorsichtiger Abnahme eines Teils des klaren Überstands wurde der Rest bei 48000xg sedimentiert. Das Sediment wurde in wenig Aqua bidest. aufgenommen, dialysiert gegen Aqua bidest. und gefriergetrocknet (TCA-Extrakt).

5.3. Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure (HF) in Anlehnung an Lipkin et al. (1969)

Eine wasserfreie Probe wurde mit 60% (v/v) wässrigem HF (Riedel de Haen) versetzt ($1\mu\text{mol Gal}$ oder $1\mu\text{mol P}_i/0.1\text{ml}$) und für 16h bei 0°C inkubiert. Die HF wurde in einem glasfreien System mit Hilfe einer Öl-Diffusionspumpe durch Überleiten über NaOH Plättchen entfernt. Der Rückstand wurde in 0.2 ml eiskaltem Aqua bidest. aufgenommen und wieder auf obige Weise getrocknet.

Der Rückstand wurde mit wenig Aqua bidest. versetzt und mit 1M LiOH neutralisiert. Unlösliche Bestandteile wurden in einer Laborzentrifuge ($8000\times g$, 10min) sedimentiert und vom Überstand getrennt. Das Sediment wurde mit Aqua bidest. gewaschen und zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden vereinigt und je nach Weiterverwendung gefriergetrocknet oder direkt eingesetzt.

5.4. Salzsäurehydrolysen

5.4.1. Totalhydrolyse - zur Freisetzung von Aminosäuren und Aminoazuckern

Zu trockenen Proben wurde in Fiolaxreagenzgläsern 4M HCl gegeben, die Reagenzgläser wurden zugeschmolzen und 16h bei 100°C im Trockenschrank inkubiert. Nach Abkühlen und Öffnen der Reagenzgläser wurde die HCl durch Überleiten eines gereinigten Luftstroms entfernt. Der trockene Rückstand wurde in wenig Aqua bidest. aufgenommen und zur vollständigen Entfernung von HCl bis zur Trockne eingeblasen.

5.4.2. Hydrolyse von Glykosiden

Glykosidische Bindungen wurden in der Regel durch saure Hydrolyse mit 2M HCl, 100°C , 3h gespalten. Zur quantitativen Bestimmung von Aminoazuckern wurden Totalhydrolysen (4M HCl,

100°C, 16h) durchgeführt.

5.4.3. Bestimmung der Hydrolyseraten mit verschiedenen Säurekonzentrationen

Die trockenen Proben wurden mit HCl (0.01M bis 2.0M HCl) versetzt, bestimmte Zeitintervalle verschlossen bei 100°C inkubiert und danach sofort in einem Eisbad abgekühlt. Durch Zugabe von 1M oder 2M NaOH wurden die Proben neutralisiert und durch Passage einer kleinen mit Ionenaustauschharz (Amberlite AG MB-3, Serva) gefüllten Säule von anorganischen Salzen befreit.

6. Enzymatische Behandlungen der Zellwände und der extrahierten Polysaccharide

6.1. Behandlung der Zellwände mit Mutanolysin (Siegel et al., 1981)

ZWtrp, SDS wurden in 0.02M Tris/HCl, 10mM MgCl₂, pH 6.8, suspendiert und mit Mutanolysin (12U/mg ZWtrp, SDS; Streptomyces globisporus, Sigma) unter Toluolatmosphäre bei 37°C inkubiert. Die Hydrolyse von Zellwänden wurde durch Absorption bei 578nm verfolgt. Nachdem kein weiteres Absinken der Absorption durch eine abermalige Zugabe von Mutanolysin erreicht werden konnte, wurde der Ansatz 10min auf 100°C erhitzt, abgekühlt und zentrifugiert (48000xg, 20min). Der Überstand wurde gegen Aqua bidest. dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

6.2. Alkalische Phosphatase

Zur Bestimmung von Orthophosphat-Monoestern wurden Proben in 0.05M Tris/HCl, pH 8.0, aufgenommen und mit alkalischer Phosphatase (0.3U/200nmol P_i; Kälberdarm, Boehringer) bei 37°C

16h unter Toluolatmosphäre inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 5min auf 100°C erhitzt, abgekühlt und bei 8000xg zentrifugiert. Im Überstand befindliches freies anorganisches Phosphat wurde ohne vorherige Veraschung (siehe 9.5) direkt colorimetrisch bestimmt.

Die Aktivität des Enzyms wurde durch eine Parallelprobe mit Glycerin-3-Phosphat überprüft.

6.3. Exo- β -Galaktofuranosidase (Rietschel-Berst et al., 1977)

Wasserlösliche Proben (200-300 nmol Galaktose) wurden in 200 μ l 66mM Acetatpuffer, pH 4.0, gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzymrohextrakts von Penicillium charlesii (siehe 10.3) gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C 150min und in einem zweiten Ansatz 17h. Danach wurden die Proben 10min in einem kochenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und bei 8000xg, 5min zentrifugiert. Im Überstand befindliche freigesetzte Galaktose wurde mit β -Galaktose-Dehydrogenase bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde in einem Parallelansatz durch Zugabe von Peptidophosphogalaktomannan (10.2.) kontrolliert.

6.4. Glykohydrolasen (Bergmeyer, 1974)

Zur Hydrolyse terminaler galaktosidischer Bindungen wurden α - und β -Galaktosidase verwendet.

Die Probe wurde mit α -Galaktosidase (Aspergillus niger, Sigma) in 10mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5, 48h bei Raumtemperatur unter Toluolatmosphäre inkubiert. Freigesetzte Galaktose wurde mit β -Galaktose-Dehydrogenase bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde mit Melibiose (0- α -D-Gal_p-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc_p) als Substrat kontrolliert.

Der Test mit β -Galaktosidase (E.coli, Sigma) in 0.1M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.3, wurde in gleicher Weise durchgeführt. Als Kontrollsubstanz diente Lactose (0- β -D-Gal_p-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc_p).

7. Chromatographische Methoden

7.1. Flüssigchromatographie

Die Gelmaterialien wurden nach Angaben des Herstellers gequollen, äquilibriert in Puffer, entgast und in eine Säule gefüllt. Der hydrostatische Druck entsprach dabei dem einer halben Säulenhöhe. Die gefüllte Säule wurde vor dem Auftragen der Probe mit drei Säulenvolumen Puffer äquilibriert. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit einer peristaltischen Pumpe (LKB) eingestellt. Fraktionen wurden nach Messung der Transmission bei 206nm und 254nm (LKB 2089 Uvicord III) und der Leitfähigkeit (WTW LF 42; Elektrode LDM/S) gesammelt. Die Säulenläufe wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

7.1.1. Gelfiltration

Die Gelchromatographie an Bio-Gel P-2 extra fine (Biorad) diente der Trennung monomerer und oligomerer Zucker bzw. Zuckeralkohole.

Säule:	Glassäule (Pharmacia) 100.0x1.6cm Gelhöhe 95cm
Elutionsmittel:	Aqua bidest.
Elutionsgeschwindigkeit:	8ml/h
Fraktionsvolumen:	2ml

Die Gelchromatographie an Sephacryl S-300 superfine (Pharmacia) diente der Bestimmung des Stokeschen Radius der extrahierten Polysaccharide im Vergleich zu Dextranen bekannten Molekulargewichts (T10, T40, T70, Pharmacia).

Säule:	Acrylglassäule 150.0x2.5cm Gelhöhe 145cm
Elutionsmittel:	0.1M Ammoniumacetat, pH 7.0,
Elutionsgeschwindigkeit:	24ml/h
Fraktionsvolumen:	4ml

7.1.2. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Pharmacia)

Der vom Hersteller vorgequollen gelieferte Anionenaustauscher wurde auf einer Glasfritte mit 3M NaCl und 0.01M Tris/HCl, pH 7.0, äthanolfrei gewaschen, entgast und in eine Säule gefüllt. Vor Gebrauch wurde das Gel mit drei Säulenvolumen Puffer äquilibriert. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 3M NaCl.

Säule:	Acrylglassäule 15.0x1.7cm
Gradienten Mischgefäß:	0.01M Tris/HCl, pH 7.0, - NaCl
Elutionsgeschwindigkeit:	20ml/h
Fraktionsvolumen:	2ml

7.2. Gaschromatographie

Neutralzucker, Aminosucker und Polyole wurden gaschromatographisch bestimmt (Albersheim et al., 1967; Holligan und Drew, 1971).

7.2.1. Derivatisierung

Da reduzierende Zucker nach Peracetylierung auf Grund ihrer Konfiguration zwei Derivate ergeben (α/β -Anomere) und damit bei komplexer Probenzusammensetzung keine optimale Trennung erreicht werden kann, wurden diese Zucker zuerst reduziert und dann in Alditol- bzw. Polyolacetate überführt.

Die Reduktion der Aldehydgruppe erfolgte durch Zugabe von Natriumborhydrid in 0.1M Ammoniak (5mg in 0.5ml/10-50 μ mol reduzierender Zucker) zur Probe, die in 0.5ml 0.1M Ammoniak gelöst wurde. Der Reduktionsansatz wurde für 60min bei 37°C belassen. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde durch tropfenweise Zugabe von Essigsäure zerstört. Das bei der Reduktion entstandene Borat wurde als flüchtiger Borsäuremethylester entfernt. Dazu wurde die Probe viermal in Gegenwart von jeweils 1ml Methanol zur Trockne eingeblasen.

Die trockene Probe wurde anschließend acetyliert. Dazu wurde zur Probe eine Mischung aus 1 Teil getrocknetem Pyridin und 1 Teil Essigsäureanhydrid (0.2ml jeweils/10-50µmol Polyol) gegeben. Das Reagenzglas wurde zugeschmolzen und 60min bei 60°C (Reacti-Therm, Pierce) inkubiert.

Danach wurde die Probe in Eis abgekühlt, aufgebrochen und zweimal mit 0.5ml Chloroform unter Nachspülen in ein Spitz-zentrifugenröhrchen überführt, eingeblasen, nochmals mit 1ml Chloroform versetzt und wieder zur vollständigen Entfernung des Pyridins eingeblasen.

Zur Abtrennung der bei der Derivatisierung gebildeten anorganischen Salze wurden der Probe 1ml Aqua bidest. und 1ml Chloroform zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde die Chloroformphase entnommen, in ein Injektionsgläschen überführt, eingeblasen und zum Einspritzen in den Gaschromatographen in einer definierten Menge Chloroform neu aufgenommen.

7.2.2. Gaschromatographische Bedingungen (Schäffler, 1982)

Gaschromatograph (GC) Packard Modell 428 mit Flammenionisationsdetektor (FID)

Brenngase:	Synthetische Luft: 200ml/min
	Wasserstoff: 20ml/min
Trärgas:	Stickstoff: 20ml/min
Trennsäule:	Glassäule 100x0.2cm, gefüllt mit 3% SP 2340 auf 100/120 Supelcoport (Supelco Inc.)
Temperaturprogramm:	Injektorblock: 270°C
	Detektor (FID): 280°C
	Säulenofen: 140°C, 2min isotherm 140°C-270°C, 8°C/min 270°C isotherm, Zeit je nach Probe.

Die Signale des GC wurden mittels eines Schreibers (Packard) und eines programmierbaren Integrators (Spectra Physics,

System 1) ausgewertet. Die Zuordnung der Detektorsignale erfolgte auf Grund ihrer Retentionszeiten im Vergleich zu authentischen Standardsubstanzen, die unter gleichen Bedingungen bearbeitet und eingespritzt wurden (Abbildung 1). Zur Präzisierung der Zuordnung wurden Probe und Standardsubstanzen cochromatographiert. Dabei wurden Retentionszeiten und Verstärkung der Detektorsignale registriert. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der Methode der internen oder externen Standardisierung.

7.3. Dünnschicht-Chromatographie

Für die aufsteigende Dünnschicht-Chromatographie wurden Kieselgel-Glasplatten (Merck) verwendet. Das Fließmittel bestand aus 1-Propanol/Ammoniak/H₂O = 40/60/5 (v/v/v). Die Detektion erfolgte mit dem Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenz (9.10).

7.4. Dünnschicht-Elektrophorese

Zur Dünnschicht-Elektrophorese wurden Kieselgel-Glasplatten (Merck) und eine Apparatur zur Flachgel-Fokussierung (LKB) benützt. Das Puffergemisch bestand aus Pyridin/Eisessig/H₂O = 10/4/86 (v/v/v), pH 5.3. Die Dauer der Elektrophorese betrug 2-3h bei einer Feldstärke von 30V/cm. Die Detektion erfolgte mit dem Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenz (9.10).

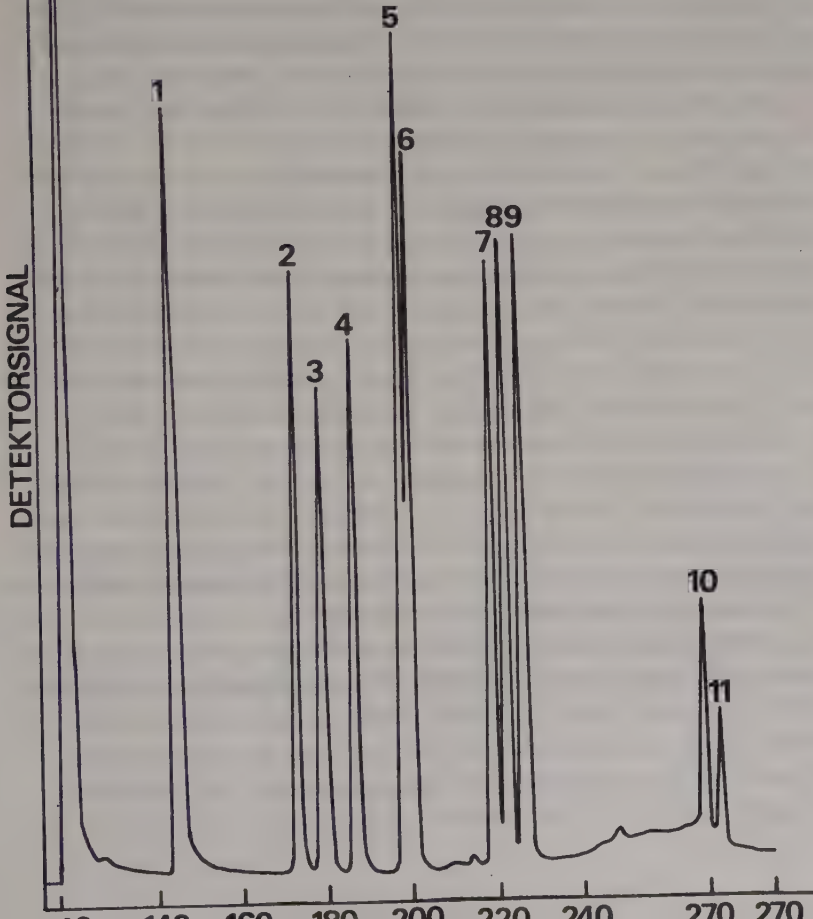
7.5. Aminosäurenanalysator

Aminosäuren und Aminosucker wurden nach Hydrolyse (5.4.1.) mit Hilfe eines Aminosäurenanalysators (Biotronic, Modell LC 6001) im Vergleich zu einem Standardgemisch qualitativ und quantitativ bestimmt.

Abbildung 1:

Gaschromatographische Trennung eines Alditol-acetate Standardgemisches bestehend aus Zuckeralkoholen, Zuckern und Aminoszuckern, die reduziert (red.) und acetyliert (ac.) wurden. Die Detektorsignale entsprechen jeweils 10nmol.

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1: Glycerin (ac.) | 7: Mannose (red.,ac.) |
| 2: Erythrit (ac.) | 8: Galaktose (red.,ac.) |
| 3: Threit (ac.) | 9: Glucose (red.,ac.) |
| 4: Rhamnose (red.,ac.) | 10: Glucosamin (red.,ac.) |
| 5: Ribit (ac.) | 11: Galaktosamin (red.,ac.) |
| 6: Arabit (ac.) | |



8. Perjodat-Oxidation

8.1. Glykolspaltung durch Smith-Abbau (Yamaguchi et al., 1970)

Perjodsäure kann die Bindung vicinaler Hydroxylgruppen (1,2 Glykole) unter gleichzeitiger Oxidation spalten. Die nach Oxidation mit Perjodat, Reduktion mit Natriumborhydrid und milder Hydrolyse (Smith-Abbau) erhaltenen Bruchstücke können für die Ausgangsverbindungen charakteristisch sein. Dabei können zur Strukturaufklärung sowohl polymere als auch oligomere glykolhaltige Verbindungen eingesetzt werden.

Das Probenmaterial wurde in 0.1M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, der 0.1M Natriumperjodat enthielt, aufgenommen (20 μmol NaJO_4 / μmol Zucker). Eine Hälfte der Proben wurde 24-144h im Dunkeln bei 4°C inkubiert, die andere Hälfte wurde 48h im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen.

Zur Zerstörung des überschüssigen Perjodats wurde 1mol Äthylenglykol/mol Perjodat zugegeben, und die Probe 1h bei 37°C inkubiert.

Die bei der Perjodat-Oxidation entstandenen Carbonylgruppen wurden nach Einstellung des pH-Wertes der Probe auf pH 8-9 mit 1M Ammoniak durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert (2h, 37°C). Überschüssiges Natriumborhydrid wurde anschließend durch tropfenweises Hinzufügen von Essigsäure zerstört.

Falls polymere Ausgangsverbindungen eingesetzt wurden, und die Glykolspaltung dies erlaubte, wurden die Proben nach der Reduktion gegen Aqua bidest. dialysiert. Bei oligomeren Verbindungen wurden die beim Smith-Abbau entstandenen anorganischen Salze durch Passage einer kleinen Ionenaustauschersäule (Amberlite AG MB-3, Serva) entfernt.

Die anschließend gefriergetrockneten Proben wurden entweder einer milden Hydrolyse (0.5M HCl, 8h, Raumtemperatur) oder zum Nachweis der durch Perjodat nicht gespaltenen Verbindungen einer Hydrolyse mit 2M HCl (100°C, 3h) unterzogen. Die weitere Aufarbeitung des Probenmaterials für die Gaschromatographie erfolgte wie unter 7.2.1. beschrieben.

8.2. Glykolspaltung mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung nach Kabat und Mayer (1971)

Zur Bestimmung des bei der Perjodat-Oxidation freigesetzten Formaldehyds wurden die Proben zuerst für 24h bei 4°C im Dunkeln mit 0.05M Natriumperjodat in 0.1M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, oxidiert (20µmol NaJO₄/1µmolGal).

Ein Aliquot des Testansatzes (10-20µl = 0.1-1.0µg gebildeter Formaldehyd) wurde mit 5µl 4M Salzsäure angesäuert. Das bei der Glykolspaltung nicht verbrauchte Perjodat wurde durch Zugabe von 10-20µl 0.4M Natriumsulfit zerstört.

Anschließend wurde die Probe mit Aqua bidest. auf 100µl aufgefüllt und mit 1ml 1% (w/v) Chromotropsäure (4,5-Dihydroxy-Naphthalin-2,7-Disulfonsäure, Di-Natriumsalz, Sigma) versetzt. Die Probe wurde 30min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach erfolgter Abkühlung wurde die Extinktion der Probe bei 570nm gemessen.

Als Standard wurde parallel dazu 10µg Formaldehyd mitgeführt. Zur Überprüfung der vollständigen Oxidation wurden unter gleichen Bedingungen 0.3µmol Glycerin-3-Phosphat durch Perjodat oxidiert.

9. Analytische Nachweise

9.1. Bestimmung von Galaktose (Bergmeyer, 1974; Avigad et al., 1962)

Freie und gebundene Galaktose wurde enzymatisch mit β-Galaktose-Dehydrogenase (Sigma) bzw. D-Galaktose-Oxidase (Sigma) quantifiziert. Die Bestimmung mit D-Galaktose-Oxidase erfolgte colorimetrisch durch Zugabe von Peroxidase (Boehringer) und o-Dianisidin (Sigma) in 0.1M Phosphatpuffer, pH 7.0.

9.2. Bestimmung von Glucose (Bergmeyer, 1974)

Freie Glucose wurde enzymatisch mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Boehringer) bestimmt.

Falls freie Glucose und freie Galaktose gemeinsam in der Probe vorlagen, wurde zuerst der Galaktose-Gehalt mit β -Galaktose-Dehydrogenase und anschließend im gleichen Ansatz Glucose enzymatisch quantifiziert.

9.3. Bestimmung von Glycerin (Bergmeyer, 1974)

Freies Glycerin wurde enzymatisch durch Zugabe einer Mischung von Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase (Sigma) sowie von Glycerokinase (Sigma) quantitativ bestimmt.

9.4. Bestimmung von Neutralzuckern

Neutralzucker in polymerer und monomerer Form wurden nach Dubois et al. (1956) mit 5% (w/v) wässrigem Phenol unter Einwirkung konzentrierter Schwefelsäure colorimetrisch bestimmt (200 μ l Probe/200 μ l 5% Phenol/1ml konz. H_2SO_4). Eine quantitative Bestimmung war mit dieser Methode nur dann durchführbar, wenn die zu bestimmende Aldose als Standard unter gleichen Bedingungen mitgeführt wurde.

9.5. Bestimmung von Phosphat (Ames und Dubin, 1960)

Die Bestimmung anorganischen Phosphats erfolgte nach Veraschung der Probe mit Magnesiumnitrat als Oxidationsmittel colorimetrisch. Dazu wurden der Probe 0.7ml 0.42% (w/v) Ammoniummolybdat in 0.5M Schwefelsäure zugegeben, der entstandene Phosphomolybdat-Komplex wurde durch gleichzeitige Zugabe von 0.1ml 10% (w/v) Ascorbinsäure-Lösung reduziert. Nach einer Inkubation von 60min bei 37°C wurde die Extinktion der Probe im Vergleich zu einem Phosphat-Standard (Sigma) bei 820nm gemessen.

9.6. Morgan-Elson-Test

Zur Bestimmung freier N-acetylierter-Aminozucker wurde der von Reissig et al. (1955) modifizierte Morgan-Elson-Test verwendet.

Die Proben (0.5ml) wurden mit 0.1ml 0.8M Kaliumboratpuffer, pH 9.2, in einem kochenden Wasserbad für 3min erhitzt. Nach dem Abkühlen in Eiswasser wurden der Probe 3ml des p-Dimethylaminobenzaldehyd-(DMAB)-Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubation von 20min bei 37°C wurde die Extinktion der Probe bei 578nm gemessen.

Glykosidisch substituierte N-Acetyl-Aminozucker mit reduzierendem C₁-Kohlenstoffatom wurden nach einer Modifikation von Knox und Hall (1965) des Morgan-Elson-Tests quantifiziert. Dazu wurden die Proben in einem Phosphatpuffer, pH 7.0, erhitzt, um β -Elimination eines substituierten, reduzierenden N-Acetyl-Aminozuckers zu vermeiden. Nach dem Erhitzen der Probe kann eine Farbauscheidung mit dem DMAB-Reagenz nur dann entstehen, wenn dessen C₁- und C₄-Kohlenstoffatome sich in keiner glykosidischen Bindung befinden. Ein C₃-substituierter, reduzierender N-Acetyl-Aminozucker hat nach Knox und Hall (1965) eine stärkere Chromogen-Bildung mit dem DMAB-Reagenz zur Folge als ein freier N-Acetyl-Aminozucker.

Die Proben mit gebundenem N-Acetyl-Aminozucker wurden in Phosphatpuffer, pH 7.0, in einem kochenden Wasserbad 45min erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und mit dem DMAB-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 20min bei 37°C wurde die Extinktion der Probe bei 550nm gemessen.

9.7. Sulfat-Bestimmung mit Benzidin (Antonopoulos, 1962)

Die Sulfatestergruppen wurden mit 6.5M Ameisensäure bei 100°C, 4h oder 24h hydrolysiert. Ein Aliquot der hydrolysierten Probe wurde in einem Spitzzentrifugenröhrchen mit 0.5ml 96% Äthanol, 0.2ml Benzidin (0.5% (w/v) Benzidin

in 96% Äthanol) und 0.5ml Amylalkohol versetzt und 60min bei 0°C stehen gelassen. Die Probe wurde 10min in einer Laborzentrifuge zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1ml Aceton-Äthanol (1:1 (v/v)) und 0.5ml Amylalkohol suspendiert und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag nochmals mit 1ml Aceton-Äthanol gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 3ml 1M HCl und 2ml Aqua bidest. gelöst und mit 1ml 0.1M Natriumnitrit versetzt. Nach 3min wurde der Probe 5ml Thymol-Reagenz (0.5% (w/v) Thymol in 2M NaOH) zugefügt. Die Extinktion der Probe wurde bei 505nm gemessen. Als Standard diente eine 1mM Magnesiumsulfat-Lösung.

9.8. Sulfat-Bestimmung mit Rhodizonat (Terho und Hartiala, 1971)

Die Hydrolyse von Sulfatestergruppen erfolgte mit 4M Salzsäure bei 100°C für 4h. Zur wässrigen Probe (0.5ml) wurden 2ml Äthanol, 2ml Bariumchloridpuffer (10ml 2M Essigsäure, 2ml 0.005M BaCl₂, 8ml 0.02M NaHCO₃ und 80ml Äthanol absolut) und 1.5ml Natriumrhodizonat (5mg Natriumrhodizonat in 20ml Aqua bidest. gelöst, mit 100mg L-Ascorbinsäure versetzt und mit Äthanol auf 100ml aufgefüllt) gegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 10min im Dunkeln stehen gelassen. Die Extinktion der Proben wurde bei 520nm gemessen. Parallel dazu wurde ein Aliquot eines 1mM Magnesiumsulfat-Standards mitgeführt.

Der colorimetrische Nachweis kann durch das Vorhandensein von Anionen wie Phosphat gestört werden. Die Rhodizonat-Methode ist jedoch empfindlicher als die Benzidin-Methode.

9.9. Ribit-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung wurde Ribit durch Erhitzen und unter Säureeinwirkung (4M HCl, 100°C, 16h) vollständig in 1,4-Anhydro-D,L-Ribit überführt (Soltzberg, 1970). Die Be-

stimmung erfolgte nach Entfernung der Salzsäure und Acetylierung von Anhydroribit mit dem Gaschromatographen unter Verwendung eines auf gleiche Weise behandelten Ribit-Standards (externer Standard).

9.10. Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenz (nach Merck, 1970)

Zucker wurden auf Kieselgel-Dünnschicht-Chromatogrammen mit Hilfe des Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenzes sichtbar gemacht. Dazu wurden 3g Phenol und 5ml konzentrierte Schwefelsäure in 95ml Äthanol gelöst und auf das Chromatogramm gesprüht. Zur Nachbehandlung wurden die Chromatogramme 10min auf 100°C erwärmt.

9.11. Schwefelsäure-Sprühreagenz (nach Merck, 1970)

Gleiche Volumen konzentrierter Schwefelsäure und Methanol wurden unter Kühlung gemischt und auf die Kieselgel-Platte gesprüht. Zur Nachbehandlung wurde die Platte auf 100°C erwärmt.

10. Verschiedene Methoden

10.1. Gewinnung von Galaktomannan aus den Zellwänden von Aspergillus niger (Bardalaye und Nordin, 1977)

Aspergillus niger NRRL 326 wurde 3 Tage in Malzextrakt-Medium unter leichtem Schütteln angezogen.

Das Mycel wurde durch Filtration vom Medium abgetrennt und mit einem Ultra-Turrax (Ika) in wenig Aqua bidest. homogenisiert. Durch zweimalige Passage einer French-Press (American Instrument Company, USA) bei 12000psi wurden die suspendierten Hyphen geöffnet. Danach wurde die Zellhüllensuspension zweimal bei 4°C mit Aqua bidest. gewaschen. Die sedimentierten Zellwände wurden zur weiteren Behandlung gefriergetrocknet (622mg).

Zur Entfernung des Nigerans wurden die Zellwände zweimal mit kochendem Aqua deion. extrahiert, sedimentiert und wieder gefriergetrocknet.

Um einen Abbau des Zellwandpolysaccharids bei der anschließenden alkalischen Extraktion zu vermeiden, wurden reduzierende Zucker des Polysaccharids zweimal mit Natriumborhydrid bei pH 9-10 (37°C, 4h) reduziert. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde durch Zugabe von Essigsäure zerstört. Zur Alkali-Extraktion wurden die in Aqua bidest. suspendierten Zellwände mit einem gleichen Volumen 2M Natronlauge versetzt. Dieser Ansatz wurde 3h auf 100°C erhitzt, abgekühlt und durch Zentrifugation bei 48000xg, 20min, von unlöslichem Material getrennt. Das erhaltene Sediment wurde nochmals in 1M Natronlauge aufgenommen, 3h bei Raumtemperatur gerührt und sedimentiert.

Aus den beiden Zentrifugationsüberständen der Natronlauge-Extraktionen wurde das Galaktomannan durch Zugabe von 3 Volumen Methanol bei 4°C ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gewonnen, mit eiskalter 1M Essigsäure neutralisiert, gegen Aqua bidest. dialysiert und gefriergetrocknet (118mg). Der enzymatisch bestimmte Galaktose-Gehalt des extrahierten Galaktomannans betrug 0.45µmol/mg. Die von Bardalaye und Nordin (1977) vorgeschlagene Struktur des Galaktomannans ist in Abbildung 2 aufgezeigt.

10.2. Präparation von Peptidophosphogalaktomannan aus dem Kulturmedium von Penicillium charlesii (Preston und Gander, 1968)

Penicillium charlesii ATCC 8730 wurde als Vorkultur in Czapek-Dox-Medium auf einem Schüttler bei 26°C angezogen und danach in Raulin-Thom-Medium überführt.

In diesem Medium wurde Penicillium charlesii 11 Tage bei 26°C kultiviert, bis etwa zwei Drittel der im Medium vorhandenen Glucose verbraucht waren, und das Medium einen pH-Wert von 2.6 hatte (Abbildung 4).

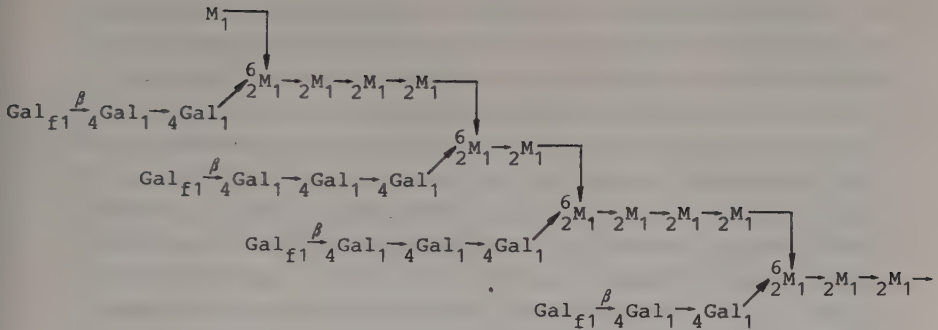


Abbildung 2:

Galaktomannan aus *Aspergillus niger* nach Bardalaye und Nordin (1977).

Abkürzungen: M, D-Mannopyranose; Gal, D-Galaktopyranose; Gal_f, D-Galaktofuranose.

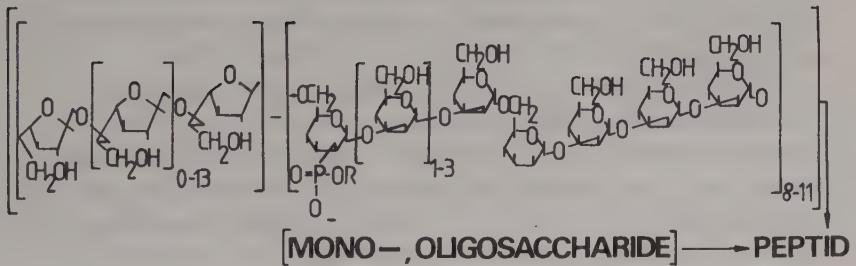


Abbildung 3:

Modell des exozellulären Glykopeptids von *Penicillium charlesii* (Gander et al., 1974).

Das Kulturmedium wurde mit einem Faltenfilter vom gebildeten Mycel abgetrennt und unter vermindertem Druck an einem Rotationsverdampfer eingeengt und gegen Aqua bidest. dialysiert. In Abänderung zu Preston und Gander (1968) wurde das Peptidophosphogalaktomannan mit N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB) nach Scott (1965) aus dem dialysierten Kulturüberstand ausgefällt. Dazu wurde dem Kulturüberstand ein gleiches Volumen 1% (w/v) wässriger CTAB Lösung zugesetzt. Zur Ausbildung eines Niederschlags wurde 1M Natronlauge zugetropft, der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation gewonnen. Dem Sedimentationsüberstand wurde wieder tropfenweise 1M Natronlauge zugegeben bis es zu einer erneuten Flockenbildung kam. Anschließend wurde wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde noch ein drittes Mal in gleicher Weise behandelt.

Die vereinigten Sedimente wurden unter Erwärmen in 1M Natriumchlorid resuspendiert. Nach erfolgtem Abkühlen wurde das Glykopeptid durch Zugabe von 5 Volumen 96% Äthanol ausgefällt. Zur vollständigen Präzipitation wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Das präzipitierte Material wurde durch Sedimentation gewonnen, in Aqua bidest. resuspendiert, gegen Aqua bidest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Zuckerkomponenten des Peptidophosphogalaktomannans wurden nach Hydrolyse gaschromatographisch als Alditolacetate bestimmt. Es ergab sich ein Verhältnis von Mannose/Galaktose/Glucose von 0.4/1.0/0.1. Der enzymatisch bestimmte Galaktose-Gehalt betrug 2.7µmol/mg, der Mannose-Gehalt 1.0µmol/mg. Ein Modell des Glykopeptids ist in Abbildung 3 dargestellt.

10.3. Gewinnung von exo- β -Galaktofuranosidase aus dem Kulturmedium von Penicillium charlesii (Rietschel-Berst et al., 1977)

Eine in Czapek-Dox-Medium gut gewachsene Vorkultur von Penicillium charlesii ATCC 8730 wurde in 1.5l Raulin-Thom-Medium überführt und auf einem Schüttler bei 26°C

inkubiert. Das Zellwachstum wurde an Hand der Glucose-Verarmung und der Änderung des pH-Wertes im Medium kontrolliert. Am 23. Tag nach Inkubationsbeginn war enzymatisch keine Glucose im Medium mehr feststellbar (Abbildung 4).

Von diesem Zeitpunkt an kam es gleichzeitig zu einer starken Änderung des pH-Wertes im Medium. Bei einem pH-Wert von 6.0 wurde das Mycel mit einem Faltenfilter vom Medium getrennt. Das klare Kulturmedium wurde auf 4°C abgekühlt. Unter gleichzeitigem Rühren wurde portionenweise Ammoniumsulfat bis zu einer 80% Sättigung zugegeben. Zur vollständigen Ausbildung des Präzipitats wurde der Ansatz für 2h bei 4°C belassen. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation (48000xg, 20min, 4°C) vom Überstand separiert.

Das Sediment wurde in wenig kaltem 66mM Acetatpuffer, pH 4.0, aufgenommen und ausgiebig gegen denselben Puffer dialysiert. Zur Entfernung unlöslicher und ausgefallener Bestandteile wurde der Enzym-Rohextrakt nochmals bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde durch Ultrafiltration (Amicon) mit einer Diaflo PM 10 Membran (Porendurchmesser 15 Å) auf ein Viertel seines Ausgangsvolumens eingeengt.

Der so erhaltene Enzym-Rohextrakt wurde bei -20°C aufbewahrt.

10.4. Dialysen

Sämtliche Dialysen wurden mit Visking-Dialysierschläuchen (Serva), die einen mittleren Porenradius von 24 Å besitzen, bei 4°C durchgeführt.

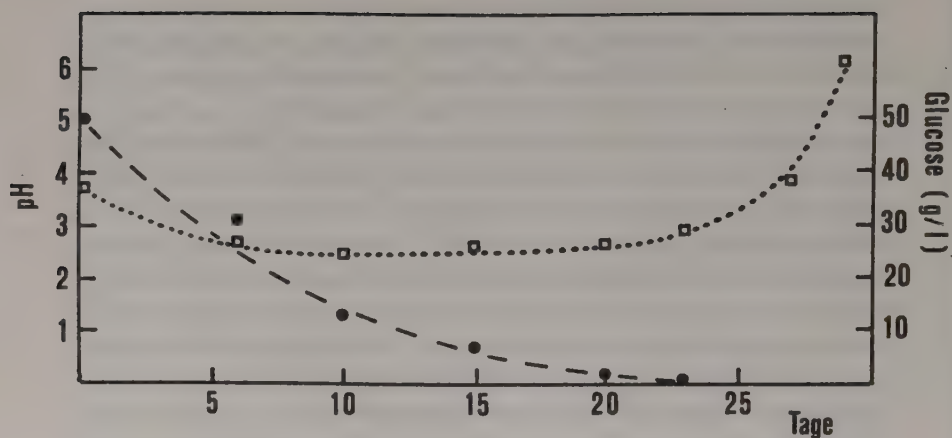


Abbildung 4: Anzucht von Penicillium charlesii

Penicillium charlesii wurde auf einen Schüttler in Raulin-Thom-Medium angezogen. Aus dem Ansatz wurden in Intervallen Proben entnommen. Das Kulturmedium wurde durch Filtration gewonnen. In dem Filtrat wurde der pH-Wert (□··□··□) gemessen und der Glucose-Gehalt (●- -●- -●) bestimmt.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchung von akzessorischen Zellwandpolymeren ausgewählter coryneformer Bakterien

A.aureescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis besitzen nach Ergebnissen von Fiedler et al. (1970) den gleichen Mureintyp A3 α (Schleifer und Kandler, 1972), und Galaktose als alleinigen Zucker-Bestandteil in den Zellwänden.

1.1. Chemische Zusammensetzung der ZWtrp,SDS und der SDS-Extrakte von A.aureescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis

Zur Identitätskontrolle der untersuchten Organismen wurde die qualitative und quantitative Aminosäurezusammensetzung der ZWtrp,SDS ermittelt. Dabei ergab sich bei C.ilicis, daß auf Grund des Mol-Verhältnisses von Glu : GlcN = 1.0 : 1.9 in der Zellwand ein Teil des Glucosamins einem Glucosaminhaltigen Zellwandpolymer angehören muß.

Galaktose konnte als Bestandteil der ZWtrp,SDS bei allen fünf untersuchten coryneformen Bakterien nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Zellwände von A.aureescens besaßen sowohl in der logarithmischen (bis O.D._{578nm} 2.5) als auch in der stationären Phase (O.D._{578nm} 5.0) des Wachstums in HD-Medium nur Galaktose neben den Komponenten des Mureins.

Das Zellwandtrockengewicht setzte sich bei den untersuchten Organismen zu 40-45% aus Murein und zu 18-27% aus Galaktose zusammen (Tabelle 3). Der Phosphat-Gehalt der ZWtrp,SDS betrug bei den einzelnen Bakterien 0.6-0.9%, so daß das Vor-

handensein von Teichonsäuren (Ward, 1981) ausgeschlossen werden mußte.

Die SDS-Extrakte der ZWtrp von A.aurescens, A.ureafaciens, B.insectiphilum und C.ilicis enthielten Mannose, die damit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Keddle und Cure (1977) und Cummins und Harris (1959) nicht kovalent mit den Zellwänden verknüpft ist (Tabelle 2). Bei C.ilicis konnte in der ZWtrp, SDS weder Rhamnose noch Glucose (Keddle und Cure, 1977), in der ZWtrp, SDS von A.histidinolovorans keine Glucose (Keddle und Cure, 1977) bestimmt werden.

Da nach intensiver Hydrolyse gegen Aqua deion. und anschließender Hydrolyse in keinem der untersuchten SDS-Extrakte der ZWtrp Galaktose gaschromatographisch nachgewiesen werden konnte, ist Galaktose als ein kovalent gebundener Bestandteil der Zellwände identifiziert.

Tabelle 2: Akzessorische Zellwandkomponenten der untersuchten Organismen

Organismus	Herkunft	Identifizierte ZW-komponenten	Beschriebene ZW-komponenten	Referenzen
A.aurescens	DSM 20116	Gal	Gal, Man	a
			Gal	b, c
A.urea-faciens	DSM 20126	Gal	Gal, Man	a
			Gal	b, c
A.histidinolovorans	DSM 20115	Gal	Gal, Glc	b
B.insectiphilum	ATCC 21686	Gal	Gal	c
C.ilicis	DSM 20138	Gal, GlcN	Gal, Glc, Man	b
			Rham	
			Gal	c

Referenzen: a, Cummins und Harris (1959); b, Keddle und Cure (1977); c, Fiedler (unveröffentlicht)

Tabelle 3: Galaktose- und Phosphat-Gehalt der untersuchten Zellwände

Organismus	$\mu\text{mol/mg ZWtrp, SDS}$	
	Galaktose	Phosphat (P_i)
<i>A. aurescens</i>	1.2	0.10
<i>A. ureafaciens</i>	1.4	0.10
<i>A. histidinolovorans</i>	1.0	0.09
<i>B. insectiphilum</i>	1.5	0.07
<i>C. ilicis</i>	1.0	0.07

1.2. Inkubation der Zellwände von A. aurescens mit Mutanolysin

Die Inkubation der Zellwände von A. aurescens mit Mutanolysin lieferte eine weitere Bestätigung der kovalenten Anbindung der Galaktose an das Murein. Durch die lytische Aktivität der Muramidase konnte Galaktose zusammen mit Mureinfragmenten in Lösung gebracht werden. Die Zellwandfragmente konnten ohne Verlust dialysiert werden. Sie wurden für weitere Versuche (1.7.1. und 1.13.) verwendet.

1.3. Versuche zur Extraktion der akzessorischen Polysaccharide

Krause und Mc.Carty (1961) gelang es mit heißem Formamid (170°C, 20min) als auch unter Einwirkung schwacher Säure (pH 2.0, 100°C) aus Zellwänden von Streptococcen der Gruppe A kovalent ans Murein gebundene Polysaccharide zu extrahieren.

Wagner et al. (1978) hatten Zellwände von Streptococcus pyogenes, die sowohl ein Polysaccharid als auch Teichonsäuren als Zellwandkomponenten besitzen, mit verschiedenen Extraktionsmitteln behandelt. Dabei verglichen die Autoren vor und nach jeder Extraktion das Erscheinungsbild der Zell-

wand im Elektronenmikroskop mit der geänderten chemischen Zusammensetzung derselben. Zur Gewinnung des Polysaccharids und der Teichonsäure erwies sich die Extraktion mit Formamid am wirksamsten, wobei das morphologische Erscheinungsbild der Zellwand im Elektronenmikroskop keine Veränderung erfuhr. Bei Lactobacillus casei, der ebenso ein Polysaccharid als Zellwandbestandteil besitzt, konnten Knox und Hall (1965) aufzeigen, daß die Anbindung des reduzierenden Endes des Polysaccharids über eine Phosphodiester-Bindung an das Murein erfolgt. Somit bestand zwischen dem reduzierenden Ende des Polysaccharids und der an das Murein gebundenen Phosphatgruppe eine hydrolyselabile Bindung, die zur Extraktion des Polysaccharids genutzt werden konnte.

Nachdem das Zellwandtrockengewicht der untersuchten coryneformen Bakterien einen geringen Phosphat-Anteil aufweist, wurde bei der Wahl der Extraktionsmittel von einer ähnlichen Mureinanbindung der Galaktosehaltigen Polysaccharide ausgegangen.

Zusätzlich zu Formamid und schwacher Säure wurden zur Extraktion noch Reagenzien, die Phosphoester-Bindungen spalten können (Fluorwasserstoffsäure, Natronlauge), verwendet. Die Extraktionsmittel und die zur jeweiligen Extraktion angewandten Bedingungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Extraktionsreagenzien und -bedingungen zur Gewinnung der Zellwandpolysaccharide

Extraktionreagenz	Bedingungen	Referenzen
Formamid	160°C, 20min	Fuller (1938)
0.01M Salzsäure	100°C, 1h	Krause u. Mc.Carty (1961)
5% (w/v) Trichloressigsäure	4°C, 24h	Perkins (1963)
60% (v/v) Fluorwasserstoff	0°C, 16h	Fiedler et al. (1981)
1M Natronlauge	60°C, 4h	Archibald et al. (1969) Wagner et al. (1978)

1.3.1. Gegenüberstellung der verschiedenen Extraktionsmethoden

Bei den Extraktionen mit Formamid und mit Natronlauge konnten die Zellwände in zwei Fraktionen getrennt werden - in einen löslichen, nicht dialysierbaren Polysaccharid-Anteil und in den unlöslichen Murein-Rückstand.

Der Versuch das Polysaccharid mit Fluorwasserstoffsäure, verdünnter Salzsäure oder verdünnter Trichloressigsäure zu extrahieren, führte zu einer teilweisen Abtrennung des Polysaccharids vom Murein, gleichzeitig trat aber eine partielle Hydrolyse des Polysaccharids ein (1.5.2. und 1.8.1.).

Der Formamidextraktion wurde im weiteren der Vorzug gegeben, da bei einer Extraktion mit Natronlauge bei Vorhandensein freier reduzierender Zuckerenden eine teilweise Zerstörung des Polysaccharids möglich ist (Bardalaye und Nordin, 1977).

Eine Formylierung freier Hydroxylgruppen des Polysaccharids durch Formamid ist auszuschließen (Krause und Mc.Carty, 1962; Perkins, 1965; Wagner et al., 1978).

Bezogen auf das Zellwandtrockengewicht waren durch einmalige Formamidbehandlung 10% der Galaktose aus den Zellwänden extrahierbar (Tabelle 5).

Tabelle 5: Chemische Zusammensetzung der Formamidextrakte

Organismus	$\mu\text{molGal/mg}$	$\mu\text{molGlcN/mg}$	$\mu\text{molP}_i/\text{mg}$	Protein(%)
<i>A. aurescens</i>	1.7 ± 0.2	-	0.05 ± 0.01	4.0 ± 1.0
<i>A. ureafaciens</i>	1.9	-	0.07	3.0
<i>A. histidinolovorans</i>	1.4	-	0.06	3.0
<i>B. insectiphilum</i>	1.9	-	0.05	4.0
<i>C. ilicis</i>	1.4	0.3	0.02	1.0

Bei *A. aurescens* beziehen sich die angegebenen Werte auf den Mittelwert und dessen Standardabweichung bei mehreren Präparationen aus verschiedenen Wachstumsphasen.

1.4. Flüssigchromatographie der extrahierten Polysaccharide

1.4.1. Chromatographie an Ionenaustauschern

Das chromatographische Verhalten der extrahierten Polysaccharide an DEAE-Sephacel ist am Beispiel von A.aureescens in Abbildung 5 dargestellt. Die Elution vor Anlegen des NaCl-Gradienten zeigt, daß neutrale Polysaccharide vorliegen.

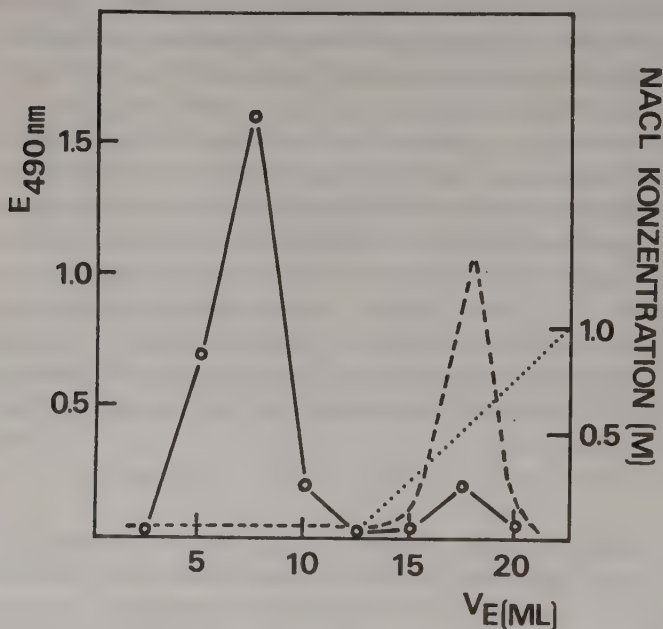


Abbildung 5: Anionenaustausch-Chromatographie des A.aureescens Formamidextrakts an DEAE-Sephacel

Die Probe (6 μ mol Gal) wurde auf eine kleine DEAE-Sephacel Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 1 Säulenvolumen 0.02M Tris/HCl, pH 8.0, und einem linearen NaCl-Gradienten in Puffer eluiert. Fraktionen von 2.5ml (15min) wurden gesammelt. Die Transmission bei 280nm (-----) und die Leitfähigkeit (.....) wurden über Durchflußmeßzellen bestimmt. Von einem Aliquot jeder Fraktion wurde der Neutralzucker-Gehalt (O—O—O) mittels der Phenol-Schwefelsäure-Methode ermittelt.

Die Fraktionen innerhalb des Gradienten enthielten geringe Mengen Protein und Neutralzucker, die gaschromatographisch als Mannose identifiziert wurden. Dies zeigte, daß der nachgewiesene Protein- und Mannose-Anteil kein Bestandteil des Polysaccharids ist.

Die extrahierten Polysaccharide haben ebenfalls nicht an Amberlite AG MB-3, einen Mischbettionenaustauscher, gebunden.

1.4.2. Chromatographie an Sephacryl S-300 sf

Um die polymere Struktur, die Homogenität und gleichzeitig den Stokeschen Radius der extrahierten Polysaccharide zu untersuchen, wurde eine Gelfiltration an Sephacryl S-300 durchgeführt. Die verwendete Säule wurde dazu zuerst mit Dextranen bekannten Molekulargewichts (T10, T40, T70; MG 1×10^4 , 4×10^4 , 7×10^4) geeicht.

Abbildung 6 zeigt als Beispiel das Elutionsprofil des Polysaccharids von A. aurescens.

Jedes der fünf Polysaccharide eluierte bei der Gelfiltration in einem symmetrischen Gipfel, so daß jeweils von homogenen Polysacchariden auszugehen war. Da die Elutionsvolumen der Polysaccharide kleiner als das des Dextrans T10 (MG 1×10^4) waren, muß der jeweilige Stokesche Radius der Polysaccharide größer als der des Dextrans T10 sein.

Ein Vergleich der Stokeschen Radien erscheint sinnvoller als eine Molekulargewichtsangabe, solange keine Angaben zur Struktur der Polysaccharide gemacht werden können. Zum Vergleich der Polysaccharide untereinander wurde trotzdem eine Gegenüberstellung der Verteilungskoeffizienten (K_{av}) und der Molekulargewichte gewählt (Abbildung 7). Dabei zeigte sich, daß alle fünf Galaktose-haltigen Polysaccharide (Galaktane) einen ähnlichen Stokeschen Radius besitzen und damit nicht nur in ihrer chemischen Zusammensetzung vergleichbare Polymere sind.

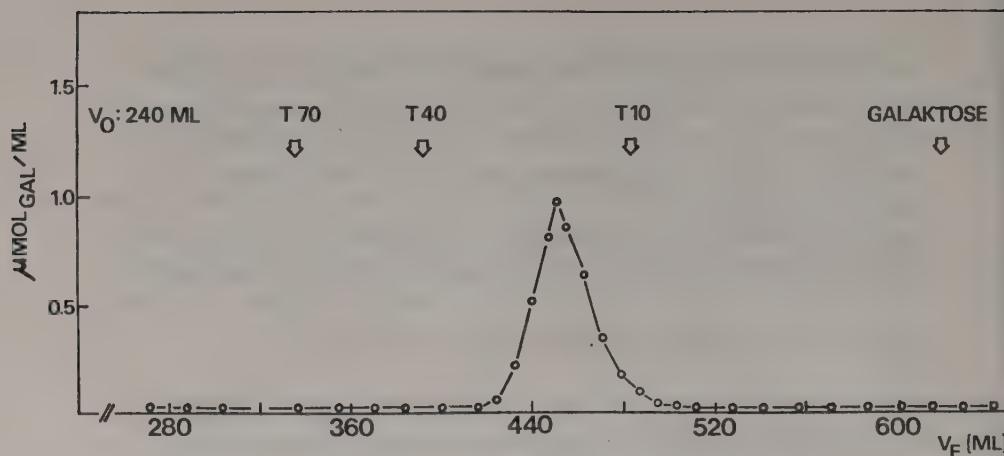


Abbildung 6: Gelfiltration des Zellwandpolysaccharids von A. aurescens an Sephacryl S-300

Ein Formamidextrakt von A. aurescens wurde auf eine 150x2.5cm Sephacryl S-300 Säule aufgetragen, mit 0.1M Ammoniumacetat, pH 7.0, eluiert, und Fraktionen von 4ml (10min) wurden gesammelt. Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurde der Galaktose-Gehalt (O—O—O) mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode im Vergleich zu einem mitgeführten Galaktose-Standard gemessen. Vorher wurde die Säule mit den Dextranen T10, T40, T70 (MG 10000, 40000, 70000) und Galaktose geeicht. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Dextranblau (MG 2×10^6) bestimmt.

1.5. Hydrolyselabilität der extrahierten Polysaccharide

Bei den Versuchen die Polysaccharide mit Fluorwasserstoffsäure (HF), verdünnter Salzsäure und verdünnter Trichlor-essigsäure aus den Zellwänden zu extrahieren, wurde deutlich, daß gleichzeitig Bindungen innerhalb der Polysaccharide hydrolysiert wurden. Da die Polysaccharide der untersuchten Bakterien nur glykosidische Bindungen und Galaktose als Zuckerkomponente enthielten, mußte die Hydrolyselabilität in der Konfiguration der Galaktose begründet sein.

Galaktose kann in gebundener Form in zwei Ringformen vor-

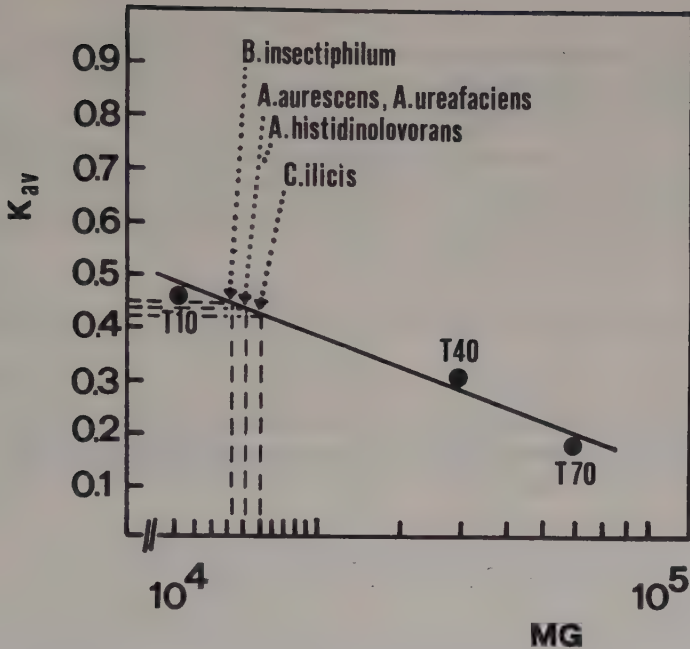


Abbildung 7: Gelfiltration der extrahierten Polysaccharide
Die Polysaccharide von *A.aurescens*, *A.ureafaciens*, *A.histidinolorans*, *B.insectiphilum* und *C.ilicis* wurden an einer zuvor mit den Dextranen T10, T40, T70 (MG 10000, 40000, 70000) geeichten Sephacryl S-300 Säule chromatographiert. (Chromatographiebedingungen siehe Abbildung 6).

liegen, nämlich als Galaktopyranose (Gal_p) und als Galaktofuranose (Gal_f). Galaktose in furanoider Bindungsart ist wesentlich hydroliselabiler als in pyranoider Form (Preston und Gander, 1968).

Um die Säurelabilität der extrahierten Polysaccharide beurteilen zu können und das Vorkommen von Gal_f abschätzen zu können, wurden das Galaktomannan aus den Zellwänden von *Aspergillus niger* (Bardalaye und Nordin, 1977) und das Glykopeptid (Peptidophosphogalaktomannan) aus dem Kulturmedium von *Penicillium charlesii* (Preston und Gander, 1968) präpariert. Wie in Abbildung 2 und 3 gezeigt, besitzt das Galaktomannan

neben Gal_f einen größeren Anteil an Gal_p, wohingegen das Glykopeptid vollständig aus unverzweigter Gal_f besteht. Zum weiteren Vergleich wurden zwei Galaktane aus den Eiw eißdrüsen von Helix pomatia und Lymnaea stagnalis herangezogen. Diese Galaktane, die von Prof.Dr. H. Bretting (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurden, enthalten ausschließlich Gal_p (Bretting et al., 1981).

1.5.1. Bestimmung der Hydrolyselabilität der Polysaccharide

Abbildung 8 gibt wieder, wie unterschiedlich sich die einzelnen Polysaccharide und das Glykopeptid gegenüber einer Hydrolyse bei 100°C für 1h mit steigender Säurekonzentration verhalten, wobei jeweils der freigesetzte, prozentuale Anteil monomerer Galaktose bestimmt wurde.

Die glykosidisch gebundene Galaktose des Galaktans von A. aurescens wurde unter gleichen Bedingungen durch steigende Säurekonzentrationen in größerem Maße freigesetzt als jene des Galaktomannans von Aspergillus niger. Im Gegensatz dazu wurde das Glykopeptid schon bei niedrigerer Säurestärke zu nahezu 100% hydrolysiert. Dies steht im Zusammenhang mit der furanoid verknüpften Galaktose und den unverzweigten Gal_f-Ketteneinheiten (Preston und Gander, 1968). Nach Bardalaye und Nordin (1977) sind im Falle des Galaktomannans 15-18% der Galaktoseketten aus Gal_f aufgebaut. Durch 0.01M Salzsäure (100°C, 1h) wurde also sämtliche vorhandene Gal_f freigesetzt. Dies läßt sich durch die exponierte Stellung der Gal_f innerhalb des Galaktomannans erklären. An jedes nicht-reduzierende Ende einer aus Gal_p bestehenden Zuckerkette ist eine Gal_f gebunden, die durch die schwache Hydrolyse als monomere Galaktose freigesetzt wurde. Die Hydrolyse der verbliebenen Gal_p-Ketten korrespondiert mit dem Hydrolyseverlauf der Galaktane von Helix pomatia und Lymnaea stagnalis (Abbildung 8).

Bei den beiden Galaktanen der Schnecken, die nur aus Gal_p

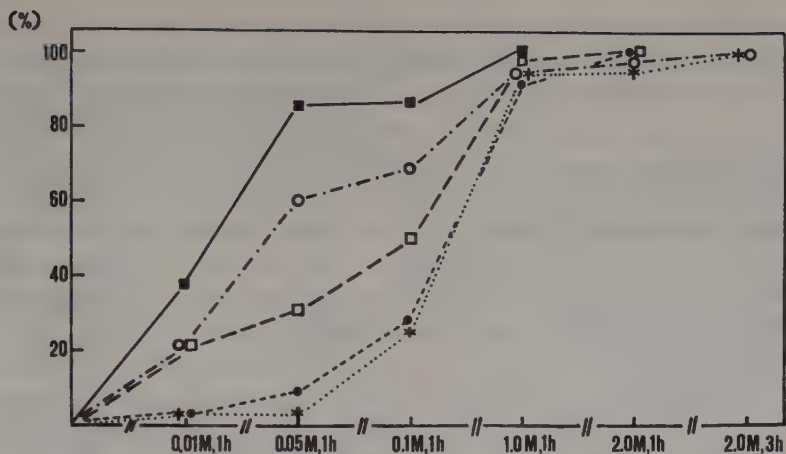


Abbildung 8: Bestimmung der Hydrolyselabilität der Polysaccharide gegenüber unterschiedlichen Säurekonzentrationen

Die angegebenen Zahlen auf der Abszisse beziehen sich auf die Molarität der verwendeten Salzsäure und die Dauer der Hydrolyse. Alle Hydrolysen wurden bei 100°C durchgeführt. Die Proben wurden nach der Hydrolyse neutralisiert. Die freigesetzte Galaktose wurde enzymatisch bestimmt und als %-Anteil des eingesetzten Galaktose-Gehalts des jeweiligen Polysaccharids ausgedrückt. Von den Polysacchariden wurden identische Mengen hydrolysiert.

- Glykopeptid von *Penicillium charlesii*
- Galaktomannan von *Aspergillus niger*
- .-○ Galaktan von *A. aureescens*
- .-● Galaktan von *Lymnaea stagnalis*
- *.....* Galaktan von *Helix pomatia*

bestehen, wurde durch 0.01M Salzsäure (100°C, 1h) nur ein sehr geringer Anteil des Galaktans als Galaktose freigesetzt. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen als Kriterium für die Hydrolyselabilität der untersuchten Polysaccharide die maximale Freisetzung monomerer Galaktose durch 0.01M Salzsäure während 1h bei 100°C (Hydrolyserate) gewählt.

Tabelle 6: Galaktose-Hydrolyseraten der Polysaccharide

Organismus/Polysaccharid	Hydrolyserate (Gal) in %	
	0.01M HCl 100°C, 1h	60% HF 0°C, 16h
<i>Helix pomatia</i> -Galaktan	2.8	5.6
<i>Lymnaea stagnalis</i> -Galaktan	2.6	8.7
<i>Aspergillus niger</i> -Galaktomannan	19.6	28.4
<i>Penicillium charlesii</i> -Glykopeptid	38.2	100.0
<i>A. aureus</i> -Galaktan	21.2	52.0
<i>A. ureafaciens</i> -Galaktan	12.1	48.6
<i>A. histidinovorans</i> -Galaktan	10.5	47.3
<i>B. insectiphilum</i> -Galaktan	15.0	54.3
<i>C. ilicis</i> -Galaktan	11.6	52.6

Die Hydrolyserate gibt den prozentualen Anteil freigesetzter Galaktose des Polysaccharids durch die jeweilige Hydrolyse an.

Die intermediären Werte der Hydrolyseraten der bakteriellen Polysaccharide zwischen jenen der "Schneckengalaktane" und des Glykopeptids von *Penicillium charlesii* deuten darauf hin, daß diese Polysaccharide ebenso wie das Galaktomannan von *Aspergillus niger* neben Gal_f auch Gal_p enthalten (Tabelle 6).

1.5.2. Hydrolyselabilität der Galaktane gegenüber 60% HF

HF wurde zur Extraktion der bakteriellen Polysaccharide aus den Zellwänden benützt, da sie unter den gewählten Bedingungen spezifisch Phosphoester-Bindungen spalten kann (Lipkin et al., 1969). Dabei zeigte sich, daß neben der Abspaltung der Polysaccharide vom Murein auch eine teilweise Hydrolyse der Galaktane zustande kam. Dies beruht darauf, daß HF eine schwache Säure mit einem pK_s-Wert von 3.14 ist, deren Neigung zur Dissoziation in wässriger Lösung gering ist (Holle-

man und Wiberg, 1971). Dieser Umstand ließ HF zur Beurteilung der Hydrolyselabilität glykosidischer Bindungen, insbesondere von Gal_f, geeignet erscheinen. Die Hydrolyse der Vergleichsgalaktane zeigte dabei folgende Ergebnisse:

Aus dem Peptidophosphogalaktomannan des Penicillium charlesii wurde die Gal_f durch HF vollständig abgespalten, wohingegen keine Mannopyranose des Glykopeptids freigesetzt wurde (Tabelle 6).

Aus dem Galaktomannan von Aspergillus niger wurde durch HF etwa ein Viertel der vorhandenen Galaktose freigesetzt. Dies ist etwas mehr als der von Bardalaye und Nordin (1977) enzymatisch bestimmte Anteil an Gal_f (18%, siehe 1.7.1.) im Galaktomannan.

Die hydrolytische Wirkung der HF gegenüber den "Schnecken-galaktanen" war sehr gering.

Aus den fünf bakteriellen Galaktanen wurden 47-54% der Galaktose durch HF freigesetzt, was darauf hinweist, daß etwa die Hälfte der Galaktosereste als Gal_f vorliegen.

1.6. Perjodat-Oxidation der Polysaccharide

Die Perjodat-Oxidation dient der Strukturaufklärung von Kohlenhydraten, da sie durch die oxidative Spaltung von Glykolen eine qualitative und quantitative Beurteilung freier vicinaler Hydroxyl-Gruppen ermöglicht.

1.6.1. Perjodat-Oxidation mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung

Aus einer Hexose kann bei der Perjodat-Oxidation nur dann Formaldehyd gebildet werden, wenn sie als Furanose vorliegt und ihre Bindungsart eine oxidative Glykolspaltung zuläßt oder durch Überoxidation (Lee et al., 1981). Aus (1→2) oder (1→3) gebundener Gal_f einer Galaktose-Kette kann durch Glykolspaltung zwischen den vicinalen OH-Gruppen der C₅- und C₆-Kohlenstoffatome von Gal_f Formaldehyd entstehen.

Dabei muß je Mol Gal_f ein Mol Formaldehyd freigesetzt werden. Bei (1→5) oder (1→6) verknüpfter Gal_f kann nur aus der nicht-reduzierenden, endständigen Galaktose einer Kette Formaldehyd abgespalten werden.

Eine Überoxidation durch Natriumperjodat wurde durch Vorversuche und die Wahl der Versuchsbedingungen ausgeschlossen. Zur weiteren Kontrolle der Reaktionsbedingungen wurden bei der Perjodat-Oxidation der bakteriellen Polysaccharide das Peptidophosphogalaktomannan von Penicillium charlesii und Glycerin-3-Phosphat mitgeführt, wobei je Mol Glycerin-3-Phosphat ein Mol Formaldehyd entstehen mußte.

Aus dem Peptidophosphogalaktomannan wurden bei der Perjodat-Oxidation pro 100nmol Galaktose 13.0nmol Formaldehyd freigesetzt (Tabelle 7). Da die Galaktosekette im Glykopeptid aus β -(1→5)-Gal_f besteht, kann nur aus der nicht-reduzierenden, endständigen Gal_f einer Galaktosekette Formaldehyd gebildet werden. Preston und Gander (1968) gehen von einer Kettenlänge von 8-10 Galaktoseresten aus. Dies stimmte mit der zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen, freigesetzten und ermittelten Formaldehyd-Menge überein, da aus einem Achtel der eingesetzten polymeren Galaktose neben anderen Spaltprodukten

Tabelle 7: Perjodat-Oxidation mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung

Organismus/Polysaccharid	nmol Formaldehyd/100nmol Galaktose
Penicillium charlesii-Glykopeptid	13.0
A.aureescens-Galaktan	6.2
A.ureafaciens-Galaktan	5.9
A.histidinolorans-Galaktan	5.0
B.insectiphilum-Galaktan	4.1
C.ilicis-Galaktan	4.4
Glycerin-3-Phosphat	29nmol Formaldehyd/30nmol Glycerin-3-Phosphat

Formaldehyd entstanden war.

Die Bildung von Formaldehyd bei der oxidativen Glykolspaltung der bakteriellen Galaktane ist ein weiterer Hinweis für das Vorliegen von Gal_f.

Die Ergebnisse der Hydrolyselabilität-Untersuchungen haben gezeigt, daß etwa die Hälfte der Galaktose in den bakteriellen Galaktanen als Gal_f gebunden ist (1.5.2.).

Durch Perjodat-Oxidation wurde aber nur aus 4.1-6.2% der Galaktose Formaldehyd freigesetzt (Tabelle 7). Aus diesem Grund muß Gal_f in den Galaktanen (1→5) und/oder (1→6) gebunden vorliegen.

Da über den Verzweigungsgrad der bakteriellen Galaktane keine Aussage gemacht werden kann, ist aus der Perjodat-Oxidation und anschließenden Formaldehyd-Bestimmung kein Rückschluß auf die Kettenlänge der Polysaccharide möglich.

1.6.2. Smith-Abbau der Polysaccharide

Das Prinzip des Smith-Abbaus beruht auf einer Perjodat-Oxidation eines Poly- oder Oligosaccharids mit anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid und milder Hydrolyse. Eine milde Hydrolyse kann angewendet werden, da glykosidische Bindungen einer Hexose, deren pyranoider Ringform durch Perjodat geöffnet wurde, sehr viel hydrolyselabiler sind als glykosidische Bindungen eines intakten Hexoserings (Yamaguchi und Mukumoto, 1977).

Die durch den Smith-Abbau erhaltenen Bruchstücke der Polysaccharide wurden gaschromatographisch an Hand ihrer Retentionszeiten und durch Cochromatographie identifiziert. Die extrahierten Polysaccharide von A.aurescens, A.urea-faciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis lieferten einheitlich Arabinose, Threitol und Glycerin als Spaltfragmente, wobei der Anteil der Arabinose im Vergleich zu Threitol bei längerer Inkubationszeit mit Perjodat abnahm. Ein geringer Teil der Galaktane war durch Perjodat nicht spaltbar und war erst nach Hydrolyse mit 2M Salzsäure (100°C,

3h) als Galaktose identifizierbar. Bei mehrmaliger Versuchsdurchführung wurden 5-10% der eingesetzten Galaktose des A. aurescens-Galaktans durch Perjodat-Oxidation bei 4°C und bei Raumtemperatur nicht gespalten. Eine Verzweigung der Galaktanketten ist also anzunehmen.

Durch die beim Smith-Abbau erhaltenen Bruchstücke lassen sich folgende Aussagen zur Struktur machen.

Arabinose kann beim Smith-Abbau einer Galaktosekette aus (1→2) und/oder (1→3) gebundener Gal_f und aus terminaler, nicht-reduzierender Gal_f entstehen (Batavyal und Roy, 1983; Op den Camp et al., 1984). Die Bindung zwischen den C₂- und C₃-Kohlenstoffatomen mit den transständigen Hydroxylgruppen ist bei endständiger, nicht-reduzierender Gal_f einer Zuckerkette relativ resistent gegenüber einer Perjodat-Oxidation (Plackett und Buttery, 1964). Es kommt bei der Perjodat-Oxidation leichter zu einer Bindungsspaltung zwischen den C₅- und C₆-Kohlenstoffatomen und damit zur Bildung von Arabinose. Da der Anteil der beim Smith-Abbau gebildeten Arabinose von den Inkubationsbedingungen mit Perjodat abhängig war, muß angenommen werden, daß Arabinose nicht aus (1→2) und/oder (1→3) gebundener Gal_f, sondern aus endständiger, nicht-reduzierender Gal_f entstanden war. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen der Perjodat-Oxidation mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung.

Threit kann innerhalb einer Galaktosekette aus (1→4) gebundener Gal_p und aus (1→5) und/oder (1→6) gebundener Gal_f gebildet werden (Bardalaye und Nordin, 1977).

Wie das Vorhandensein von Arabinose nach Smith-Abbau, der geringe Nachweis von Formaldehyd nach Perjodat-Oxidation und die Säurelabilität der Polysaccharide zeigen, sollte das durch Smith-Abbau gebildete Threit aus (1→5) und/oder (1→6) gebundener Gal_f stammen.

Glycerin kann durch Smith-Abbau aus einer terminalen, nicht-reduzierenden Hexopyranose oder -furanose oder innerhalb einer Zuckerkette aus (1→2) und/oder (1→6) gebundener Hexopyranose gebildet werden (Bardalaye und Nordin, 1977). Eine

Zuordnung des entstandenen Glycerins war beim Smith-Abbau des ganzen Polysaccharids schwer möglich (siehe 1.10.2.2.).

Zur Überprüfung des durchgeführten Smith-Abbaus wurde das Peptidophosphogalaktomannan des Penicillium charlesii unter gleichen Bedingungen herangezogen. Die (1→5) glykosidisch gebundene Gal_f des Glykopeptids ergab ebenso wie im Falle der bakteriellen Galaktane Arabinose, Threitol und Glycerin als gaschromatographisch erfaßbare Spaltprodukte.

Nach diesen Resultaten ist die furanoide Ringform der Galaktose ein gemeinsames Strukturmerkmal der Galaktane von A. aurescens, A. ureafaciens, A. histidinolovorans, B. insectiphilum und C. ilicis, wobei Gal_f auf Grund der Perjodat-Oxidation mit Formaldehyd-Bestimmung und des Smith-Abbaus (1→5) und/oder (1→6) glykosidisch gebunden ist. Ob in den Galaktanen noch eine weitere Bindungsart vorhanden ist, kann nach den Ergebnissen der Perjodat-Oxidation nicht ausgeschlossen werden.

Das Polysaccharid von C. ilicis enthält neben Galaktose noch Glucosamin, das beim Smith-Abbau nicht gespalten wurde und erst nach Hydrolyse mit 2M Salzsäure nachgewiesen werden konnte. Das Glucosamin, das im Polysaccharid wahrscheinlich N-acetyliert vorkommt, ist demnach (1→3) und/oder (1→4) glykosidisch gebunden. Da nach der Perjodat-Oxidation des Polysaccharids von C. ilicis Formaldehyd bestimmt wurde, muß zumindest ein Gal_f-Rest pro Polysaccharidkette endständig, nicht-reduzierend vorliegen (siehe 1.7.1.).

1.7. Enzymatische Untersuchungen zur Struktur der Galaktane

1.7.1. Enzymatische Hydrolyse von Galaktose durch exo-β-Galaktofuranosidase

Da die vorausgegangenen Versuche gezeigt hatten, daß zumindest ein Teil der Galaktane von A. aurescens, A. ureafaciens,

A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis aus Gal_f aufgebaut ist, wurde zur Bestätigung der Ergebnisse das Verhalten der Galaktane gegenüber dem Enzym exo- β -Galaktofuranosidase geprüft.

Penicillium charlesii scheidet nach Zuckerverarmung des Kulturmediums exo- β -Galaktofuranosidase ins Medium aus, welche die Hydrolyse des Galaktan-Anteils des exozellulären Glykopeptids katalysiert. Als weitere Substratspezifität des Enzyms geben Rietschel-Berst et al. (1977) die Hydrolyse von Galaktose aus Äthyl- β -D-Galaktofuranosiden, Methyl- β -D-Galaktofuranosiden und 6-O- β -Galaktofuranosyl-D-Galaktose an. Das Enzym wurde auch zur Strukturaufklärung des Galaktomannans aus der Zellwand von Aspergillus niger verwendet (Bardalaye und Nordin, 1977).

Die Aktivität des Enzym-Rohextrakts wurde durch Zugabe des isolierten Peptidophosphogalaktomannans und des Galaktomannans aus der Zellwand von Aspergillus niger kontrolliert. Eine Inkubation des Enzym-Rohextrakts mit den in Tabelle 8 angegebenen Polysacchariden führte zu einer teilweisen Hydrolyse der Galaktane. Aus den Polysacchariden von A.aurantus und A.histidinolovorans waren mindestens 25% der Galaktose freisetzbar, aus den Polysacchariden von A.ureafaciens, B.insectiphilum und C.ilicis waren es 10-20%.

Nachdem die bakteriellen Galaktane als Substrat für das Enzym dienten, muß terminale β -(1 $\rightarrow$ 5)- oder β -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal_f angenommen werden.

Eine enzymatische Hydrolyse der Gal_f direkt aus der Zellwand von A.aurantus gelang bemerkenswerterweise nicht. Erst nach einer Lyse der Zellwand mit Mutanolysin kam es zu einer Freisetzung von Galaktose durch den Enzym-Rohextrakt.

Die Resultate der enzymatischen Hydrolyse verdeutlichen, daß die Galaktane und das aus Galaktose und Glucosamin aufgebaute Polysaccharid von C.ilicis am nicht-reduzierenden Ende

Tabelle 8: Enzymatische Freisetzung von Galaktose durch Inkubation mit exo- β -Galaktofuranosidase

Probe	Freisetzung von Galaktose
A.aurescens ZWtrp,SDS	-
A.aurescens ZWtrp,SDS,Mutanolysin	+
A.aurescens-Galaktan	+
A.ureafaciens-Galaktan	+
A.histidinolorans-Galaktan	+
B.insectiphilum-Galaktan	+
C.ilicis-Galaktan	+

+/-, Freisetzung/keine Freisetzung; für die Probe A.aurescens ZWtrp,SDS,Mutanolysin wurde die ZWtrp,SDS mit Mutanolysin inkubiert. Die nach der Lyse der Zellwand erhaltenen löslichen Zellwandbruchstücke wurden nach Dialyse gegen Aqua deion. gefriergetrocknet (siehe 1.2.).

ihrer Ketten Gal_f besitzen. Dies unterstützt die Daten der Perjodat-Oxidation, nach denen ebenfalls Gal_f am nicht-reduzierenden Kettenende in (1 $\rightarrow$ 5) oder (1 $\rightarrow$ 6) Bindung gefordert wurde.

1.7.2. Reaktion von D-Galaktose-Oxidase mit den Galaktanen

D-Galaktose-Oxidase (Dactylium dendroides) katalysiert die Oxidation von D-Galaktose am C_6 -Kohlenstoffatom zur D-Galaktohexodialdose. Dabei verläuft die Reaktion mit polymerem Material schneller als mit monomerer D-Galaktose. Bei der Reaktion kommt es zu keiner Hydrolyse der Galaktoside (De Recondo et al., 1981; Avigad et al., 1961).

Gal_f ist dabei inert, denn die Umsetzung der Gal_f des Peptidophosphogalaktomannans zur Hexodialdose wird trotz freier OH-Gruppe des C_6 -Kohlenstoffatoms nicht katalysiert (Rietschel-Berst et al., 1977). Die pyranoid Ringform ist also eine weitere Voraussetzung für die Reaktion der D-Ga-

laktose-Oxidase.

Wegen dieser für das Enzym wichtigen Kriterien konnte D-Galaktose-Oxidase zur Strukturaufklärung der bakteriellen Galaktane herangezogen werden.

Wie Abbildung 9 zeigt, wiesen die Galaktane von A.aureescens, A.histidinolovorans, A.ureafaciens und B.insectiphilum ein unterschiedliches Verhalten gegenüber D-Galaktose-Oxidase auf.

Während die Galaktane von A.aureescens und A.histidinolovorans nicht mit D-Galaktose-Oxidase reagierten, verlief die Reaktion der Galaktane von A.ureafaciens und B.insectiphilum sehr langsam und untypisch, wenn man berücksichtigt, daß Galaktane schneller oxidiert werden als D-Galaktose. Die schwache Oxidationsreaktion könnte jedoch hinweisen, daß in diesen Fällen auch Gal_p am Aufbau der Galaktane beteiligt ist.

Eine Untersuchung von Oligosacchariden der partiell hydrolysierten Galaktane mit D-Galaktose-Oxidase soll darüber näheren Aufschluß geben.

1.8. Isolierung und Charakterisierung von Oligosacchariden der partiell hydrolysierten Galaktane

1.8.1. Hydrolyse mit HF

Die vorausgegangenen Extraktionsversuche zur Gewinnung der Galaktane und die Untersuchung ihrer Hydrolyselabilität (1.3.; 1.5.) hatten gezeigt, daß durch die Hydrolyse mit 60% HF mehr oder weniger komplex aufgebaute Oligosaccharide gebildet wurden. Da HF unter den gewählten Bedingungen spezifisch hydrolyselabile glykosidische Bindungen spaltet, erschienen die verbliebenen Oligosaccharide von Bedeutung für die strukturelle Untersuchung der Galaktane.

Wie bei den vorhergehenden Versuchen mit HF wurde eine Hydrolysedauer von 16h bei 0°C gewählt. Nach Entfernung von HF wurde das partiell hydrolysierte und neutralisierte Proben-

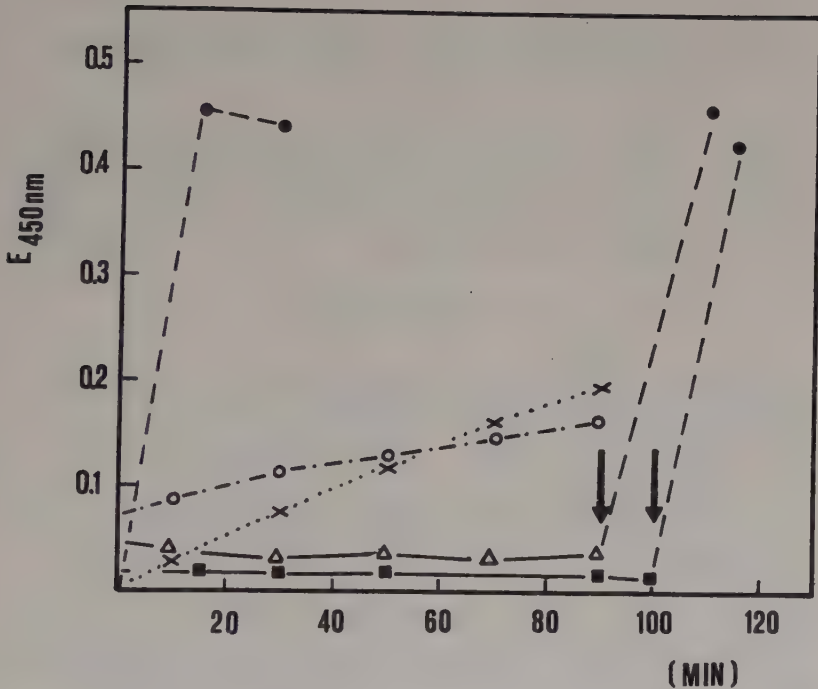


Abbildung 9: Reaktion der Galaktane mit D-Galaktose-Oxidase

Die Galaktane von *A.aureascens* (860nmol Gal; ■—■—■), *A.ureafaciens* (700nmol Gal; ○—○—○), *A.histidinolovorans* (720nmol Gal; △—△—△), *B.insectiphilum* (800nmol Gal; X—X—X) und ein D-Galaktose-Standard (420nmol Gal; ●—●—●) wurden mit D-Galaktose-Oxidase, Peroxidase und o-Dianisidin bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 450nm gemessen. Zur Überprüfung der Testansätze wurden dem Galaktan von *A.aureascens* nach 90min Inkubationsdauer und dem Galaktan von *A.histidinolovorans* nach 100min Inkubationsdauer D-Galaktose (siehe ▼) zugegeben.

material durch Passage einer Ionenaustauschersäule (Amberlite AG MB-3, Serva) gereinigt.

1.9. Untersuchungen des partiell hydrolysierten A. aurescens-Galaktans

Im weiteren sollen zuerst die Untersuchungen des partiell hydrolysierten A. aurescens-Galaktans aufgezeigt werden und anschließend mit den Partialhydrolysaten der vier anderen coryneformen Bakterien verglichen werden.

1.9.1. Gelfiltration des Partialhydrolysats

Zur Auftrennung der Oligo- und Monosaccharide nach ihrem Stokeschen Radius wurde eine Gelfiltration mit Bio-Gel P-2 (Biorad) unternommen. Im Eluat wurde die Transmission bei 254nm und 206nm gemessen.

Das bei 206nm aufgenommene Elutionsprofil unterscheidet sich von dem in Abbildung 10 gezeigten Elutionsprofil, bei dem von einem Aliquot jeder bzw. jeder zweiten Fraktion der Galaktose-Gehalt mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode bestimmt wurde, bis auf Peak D nicht. Peak D bestand aus monomerer Galaktose, wie ein Nachweis mit β -Galaktose-Dehydrogenase ohne vorherige Hydrolyse zeigte, und absorbierte deshalb bei 206nm nicht.

Das bei 254nm aufgenommene Elutionsprofil hatte nur einen Peak, dessen Elutionsvolumen bei mehrmaliger Versuchsdurchführung, im Gegensatz zu den anderen Gipfeln, nicht konstant blieb. Sein Elutionsvolumen schwankte zwischen 110 und 130ml.

Es spielte keine Rolle, ob für die partielle Hydrolyse das extrahierte Galaktan oder ZWtrp, SDS verwendet wurden. In beiden Fällen ergab sich ein identisches Elutionsprofil sowie ein gleiches quantitatives Verhältnis der einzelnen Mono- und Oligosaccharide untereinander, da durch die hydrolytische Wirkung der HF keine glykosidischen Bindungen

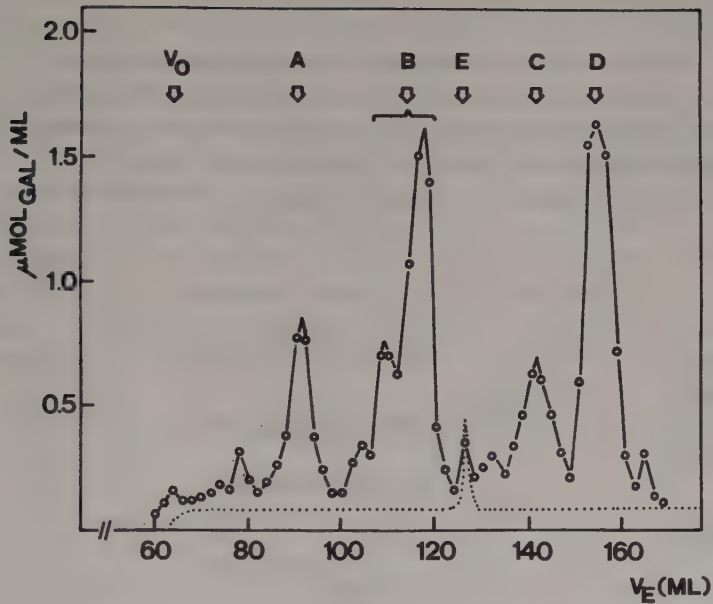


Abbildung 10: Gelfiltration des partiell hydrolysierten A. aurescens-Galaktans an einer Bio-Gel P-2 Säule

Das Galaktan von A. aurescens wurde mit 60% HF 16h bei 0°C inkubiert. Die HF wurde entfernt. Die neutralisierte und salzfreie Probe wurde an einer 100.0x1.6cm Bio-Gel P-2 Säule chromatographiert. Von einem Aliquot jeder Fraktion wurde der Galaktose-Gehalt mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode im Vergleich zu einem Galaktose-Standard ermittelt (○—○—○). Das Ausflußvolumen der Säule (V_0) wurde mit Dextranblau (MG 2x10⁶, Serva) bestimmt. Die Transmission des Eluats wurde bei 254nm gemessen (.....).

des Mureins gespalten wurden, sondern nur das akzessorische Zellwandpolysaccharid vom Murein abgetrennt und partiell hydrolysiert wurde.

1.9.2. Größenordnung der erhaltenen Bruchstücke

Um eine Angabe über die Größe der isolierten Bruchstücke machen zu können, wurde die Bio-Gel P-2 Säule vor dem Auftragen des Probenmaterials durch Gelfiltration von Stachyose, Raffinose, Lactose und Galaktose geeicht (Abbildung 11). Gipfel A lag außerhalb der Ausgleichsgeraden, die durch den

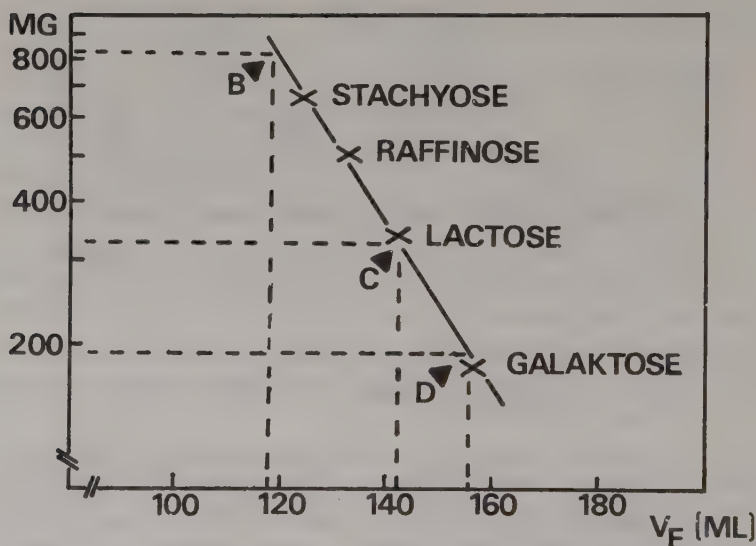


Abbildung 11: Molekulargewichtsbestimmung der Oligosaccharide

Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der durch partielle Hydrolyse gewonnenen Oligo- und Monosaccharide des *A. aurescens*-Galaktans. Zur Eichung der Bio-Gel P-2 Säule wurden Stachyose ($0-\alpha-D-Gal_p-(1\rightarrow6)-0-\alpha-D-Gal_p-(1\rightarrow6)-0-\alpha-D-Glc_p-(1\rightarrow2)-\beta-D-Fru_f$), Raffinose ($0-\alpha-D-Gal_p-(1\rightarrow6)-0-\alpha-D-Glc_p-(1\rightarrow2)-\beta-D-Fru_f$), Lactose ($0-\beta-D-Gal_p-(1\rightarrow4)-D-Glc_p$) und Galaktose verwendet. B, C und D entsprechen den Gipfeln Elutionsprofils in Abbildung 10.

linearen Bereich der Eichkurve gelegt wurde. Dieses Bruchstück befand sich in einem Größenbereich, der mit 10 oder mehr Monosaccharidresten als die Grenze zwischen Oligo- und Polysacchariden angesehen wird.

Gipfel B war in einem Abschnitt der Eichgeraden zu finden, der in etwa einer Größenordnung von fünf kettenförmig gebundenen Galaktoseresten entspricht. Gipfel B beinhaltetete 41% der Galaktose des partiell hydrolysierten Galaktans.

Gipfel C eluierte bei der Gelfiltration wie Lactose, sollte also ebenso ein Galaktose-Disaccharid darstellen.

Gipfel D entsprach monomerer Galaktose und umfaßte 52% der Galaktose des eingesetzten Galaktans.

1.10. Charakterisierung der Oligosaccharide des A.aureescens-Galaktans

1.10.1. Hydrolyselabilität des Oligosaccharids B

Oligosaccharid B unterschied sich in seiner geringen Hydrolyselabilität gegenüber 0.01M HCl und 60% HF eindeutig von dem nicht-partiell hydrolysierten Galaktan (Tabelle 9), wodurch auf einen Aufbau des Oligosaccharids aus Gal_p geschlossen werden konnte. Deshalb sollte eine weitere Gelfiltration klären, ob bei einer erneuten Hydrolyse mit 60% HF (0°C, 16h) das Oligosaccharid tatsächlich erhalten bleibt.

Tabelle 9: Freigesetzte Galaktose aus dem Oligosaccharid B des A.aureescens-Galaktans durch Hydrolyse mit 0.01M HCl und 60% HF

Probe	Gal-Hydrolyserate in %	
	0.01M HCL, 100°C, 1h	60% HF, 0°C, 16h
Oligosaccharid B des <u>A.aureescens</u> -Galaktans	0.9	4.0
<u>A.aureescens</u> -Galaktan	21.2	52.0

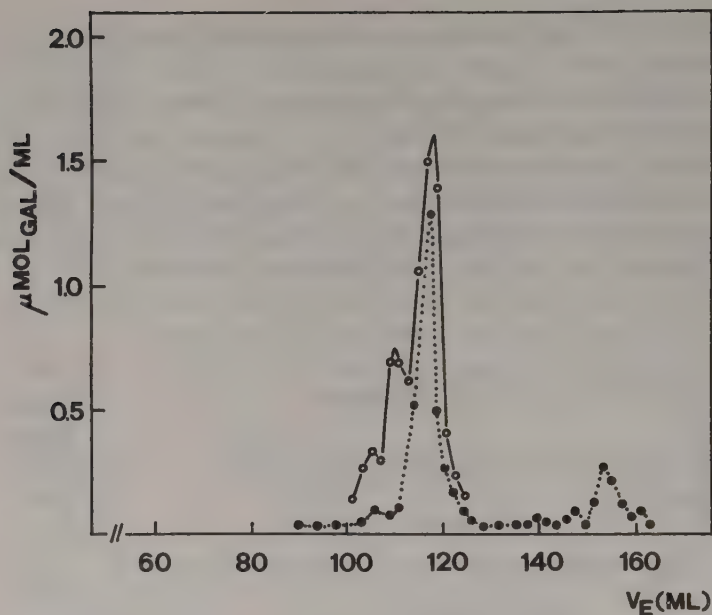


Abbildung 12: Gelfiltration des HF-behandelten Oligosaccharids B von A. aureus an Bio-Gel P-2

Das Oligosaccharid B der Abbildung 10 wurde einer neuerlichen Hydrolyse mit 60% HF (0°C, 16h) unterzogen. Nach Entfernung der HF wurde mit dem neutralisierten Hydrolysat eine Gelfiltration an Bio-Gel P-2 durchgeführt. Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurde mit Hilfe von Phenol-Schwefelsäure der Galaktose-Gehalt der Fraktionen bezogen auf einen Galaktose-Standard ermittelt (●.....●.....●, Oligosaccharid B₂). Zum Vergleich ist das Oligosaccharid B vor der HF-Hydrolyse (O—O—O) eingezeichnet. Die Bedingungen der Gelfiltration siehe Abbildung 10.

Das Elutionsprofil in Abbildung 12 zeigt wiederum einen Peak (Oligosaccharid B₂) mit dem gleichen Elutionsvolumen und damit gleicher Größe wie das ursprüngliche Oligosaccharid B. Die Schultern im Anstieg des Gipfels sind jedoch nicht mehr

ausgebildet. Daher muß es sich um Moleküle handeln, die durch Gal_f -Reste verlängert sind. Durch erneute HF-Hydrolyse wurden diese gespalten, so daß das Oligosaccharid B_2 und freie Galaktose entstanden. Das Vorliegen von Gal_f -Resten war außerdem im Smith-Abbau des Oligosaccharids B angezeigt, nachdem neben Glycerin eine geringe Menge an Arabinose und Threitol auftraten.

1.10.1.1. Enzymatische Hydrolyse des Oligosaccharids B

Durch Inkubation des Oligosaccharids B mit α -Galaktofuranosidase (1.7.1.) waren 2-3% der Galaktose enzymatisch hydrolysierbar. Dies entspricht dem Prozentsatz der durch HF-Hydrolyse freigesetzten Galaktose.

1.10.2. Oligosaccharid B_2 des A. aurescens-Galaktans

1.10.2.1. Enzymatische Oxidation mit D-Galaktose-Oxidase

Das Oligosaccharid B_2 wurde im Gegensatz zum nicht partiell hydrolysierten Galaktan durch D-Galaktose-Oxidase vollständig oxidiert, d.h. jeder Galaktosyl-Rest wurde zur D-Galaktohexodialdose umgewandelt (siehe 1.7.2.). Dies ist, neben der sehr geringen Hydrolyselabilität, ein weiterer Beweis für den Aufbau des Oligosaccharids B_2 aus Gal_p .

Die negative Reaktion des A. aurescens-Galaktans mit D-Galaktose-Oxidase läßt sich deshalb nur durch eine sterische Hinderung der D-Galaktose-Oxidase (Gathmann und Aminoff, 1981) beim Einsatz des ganzen Polysaccharids erklären.

1.10.2.2. Smith-Abbau des Oligosaccharids B_2

Eine Perjodat-Oxidation des Oligosaccharids B_2 mit anschließender Reduktion, milder Hydrolyse, nochmaliger Reduktion und Derivatisierung für die Gaschromatographie lieferte Glycerin als Spaltprodukt. Dieses Glycerin kann nur

aus (1→2) gebundener Gal_p stammen, nachdem eine (1→6)-Bindung auf Grund der Oxidation des Oligosaccharids mit D-Galaktose-Oxidase nicht möglich war.

1.10.2.3. Abbau der Oligosaccharide B und B₂ durch Glykohydrolasen

Eine Freisetzung von Galaktose aus den Oligosacchariden B und B₂ mit α-Galaktosidase (Aspergillus niger, Sigma) und β-Galaktosidase (E.coli, Sigma) erfolgte nicht, was möglicherweise durch die (1→2) glykosidische Bindung bedingt ist.

1.10.2.4. Strukturvorschlag für das Oligosaccharid B₂

Faßt man die Ergebnisse der Hydrolyselabilität des Oligosaccharids B, der Reaktion mit D-Galaktose-Oxidase und des Smith-Abbaus des Oligosaccharids B₂ zusammen, so ist als glykosidische Bindung innerhalb des Oligosaccharids B₂ eine (1→2) verknüpfte D-Gal_p zu fordern. Auf Grund des Anteils im Spaltungsmuster des Polysaccharids (Abbildung 10) ist diese Verknüpfungsweise der Galaktosereste in etwa 40% des gesamten Galaktans vorhanden (siehe Abbildung 14).

1.10.3. Oligosaccharid C des A.aurescens-Galaktans

1.10.3.1. Enzymatische Oxidation mit D-Galaktose-Oxidase

Das Oligosaccharid C reagierte mit D-Galaktose-Oxidase, wobei 65% der eingesetzten Galaktose zu D-Galaktohexodialdose oxidiert wurden.

1.10.3.2. Smith-Abbau des Oligosaccharids C

Durch den Smith-Abbau des Oligosaccharids C wurden Arabinose, Threit und Glycerin bei unterschiedlichen Perjodat-Inkubations-

dauer in variablen Verhältnissen freigesetzt.

Faßt man die Resultate der Gelfiltration, der Oxidation mit D-Galaktose-Oxidase und des Smith-Abbaus zusammen, so mußte es sich bei dem Oligosaccharid C um ein Disaccharid handeln, bei dem ungefähr die Hälfte der Galaktose mit D-Galaktose-Oxidase oxidierbar war, also aus Gal_p bestehen mußte. Der erhöhte Wert bei der D-Galaktose-Oxidase-Bestimmung war, wenn man von einem Disaccharid aus Gal_f und Gal_p ausgeht, möglicherweise durch mitgeschleppte monomere Galaktose des Gipfels D verursacht worden.

Durch das variable Verhältnis von Arabinose zu Threit bei unterschiedlicher Perjodat-Inkubationsdauer wurde die Bildung von Threit aus C₄-substituierter Galaktose ausgeschlossen. Bei längerer Perjodat-Inkubation waren Arabinose und Threit überhaupt nicht mehr nachweisbar, so daß ihre Bildung nur aus endständiger, nicht-reduzierender Gal_f resultieren konnte (siehe 1.6.2.).

Das nachgewiesene Glycerin entstammte deshalb endständiger, nicht-reduzierender Gal_f und C₂-substituierter Gal_p. Eine C₃- oder C₆-Substitution der reduzierenden Gal_p scheiden durch das Fehlen von Galaktose nach dem Smith-Abbau und durch die enzymatische Oxidierbarkeit des Oligosaccharids C aus.

1.10.3.3. Strukturvorschlag für das Oligosaccharid C

Auf Grund der aufgezeigten Ergebnisse kann für das Oligosaccharid C folgende Struktur vorgeschlagen werden: 0-β-Gal_f-(1→2)-D-Gal_p. Eine β-Bindung der Gal_f an die Gal_p ist unter Berücksichtigung der Daten der enzymatischen Hydrolyse des A. aurescens-Galaktans durch exo-β-Galaktofuranosidase (1.7.1.) anzunehmen (Abbildung 13 und 14).

1.10.4. Oligosaccharid A des A. aurescens-Galaktans

Der Smith-Abbau des Oligosaccharids A lieferte je nach Per-

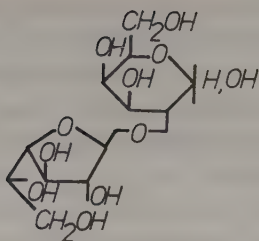


Abbildung 13: Strukturvorschlag des durch partielle Hydrolyse und Gelfiltration gewonnenen Oligosaccharids C des A. aurescens-Galaktans

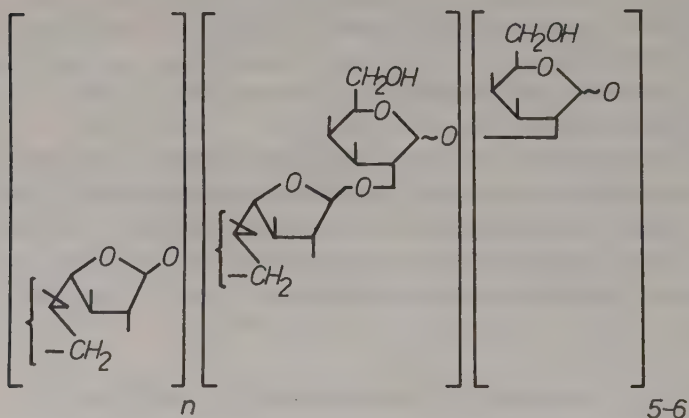


Abbildung 14: Mögliche kettenbildende Struktureinheiten des Galaktans von A. aurescens

Der Strukturvorschlag basiert auf den Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse, der Perjodat-Oxidationen und der durch partielle Hydrolyse erhaltenen Oligosaccharide B, B₂ und C.

jodat-Inkubationsdauer in wechselnden Verhältnissen Arabi-
nose, Threitol und Glycerin, was darauf hinweist, daß in diesem
Bruchstück (1→5)- oder (1→6)-Gal_f vorhanden war. Über die
Struktur kann keine weitere Aussage gemacht werden.

1.10.5. Oligosaccharid E des A. aurescens-Galaktans

Das bei 254nm aufgenommene Elutionsprofil des A. aurescens-Galaktans (Abbildung 10) zeigte nur einen Gipfel, dessen Elutionsvolumen bei mehrmaliger Versuchsdurchführung schwankte. Die gesammelten und gefriergetrockneten Fraktionen dieses nur in sehr geringen Mengen auftretenden Peaks E wurden mit 4M HCl (16h, 100°C) bzw. 2M HCl (3h, 100°C) hydrolysiert und mit Hilfe des Aminosäureanalysators und der Gaschromatographie untersucht. Als Komponenten wurden Mannosamin oder Galaktosamin und geringe Mengen Galaktose festgestellt. Eine Differenzierung zwischen den beiden Aminoszuckern war mit den gewählten Methoden nicht erreichbar. Das Spaltprodukt spiegelt möglicherweise die Anbindung des Galaktans über Mannosamin- bzw. Galaktosamin-1-Phosphat an die N-Acetyl-Muraminsäure des Mureins wieder.

1.11. Gelfiltration der partiell hydrolysierten Galaktane von A. ureafaciens, A. histidinolovorans, B. insectiphilum und C. ilicis

Die Elutionsprofile dieser vier partiell hydrolysierten Galaktane wiesen in der Anzahl und Größe der registrierten Gipfel eine große Ähnlichkeit mit dem partiell hydrolysierten A. aurescens-Galaktan auf (Abbildung 10 und 15).

Gipfel D bestand bei allen Elutionsprofilen aus monomerer Galaktose, Gipfel C bildete wieder jeweils ein Disaccharid. Die Galaktoseeinheiten der Oligosaccharide B der vier Galaktane wurden durch D-Galaktose-Oxidase zu über 90% zu D-Galaktohexodialdose oxidiert, was das Vorliegen von Gal_p mit freier OH-Gruppe am C₆-Kohlenstoffatom beweist. Dies Ergebnis wurde auch durch den Smith-Abbau bestätigt. Als Spaltprodukt wurde überwiegend Glycerin neben einem sehr geringen Anteil an Arabinose und Threit erhalten.

Am Beispiel des Oligosaccharids B von A. histidinolovorans wurde noch einmal die Hydrolyselabilität dieses Bruchstücks

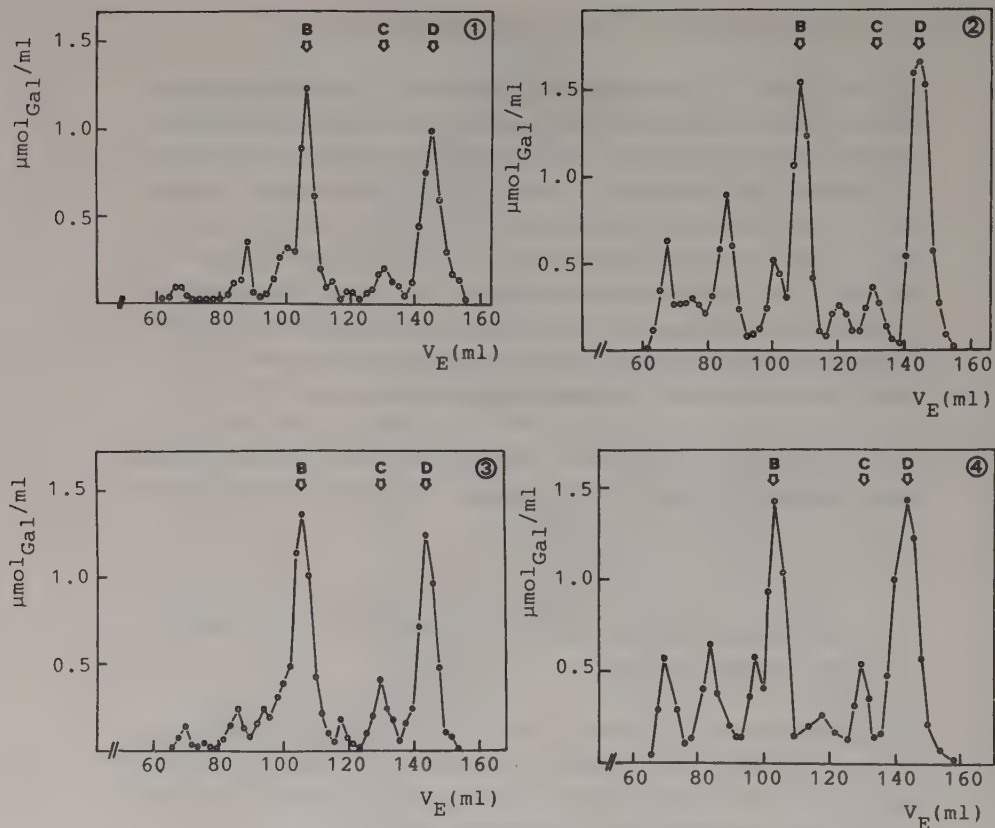


Abbildung 15: Gelfiltration der partiell hydrolysierten Galaktane

Die extrahierten Zellwandpolysaccharide von A. ureafaciens (1), A. histidinovorans (2), B. insectiphilum (3) und C. ilicis (4) wurden mit 60% HF 16h bei 0°C inkubiert. Nach Entfernung der HF wurden die neutralisierten Proben an einer 100x1.6cm Bio-Gel P-2 Säule chromatographiert. Die Säulen wurden mit Aqua bidest. eluiert. Fraktionen von 2ml (15min) wurden gesammelt. Von einem Aliquot jeder bzw. jeder zweiten Fraktion wurde der Galaktose-Gehalt mit Hilfe der Phenol-Schwefelsäure-Methode im Vergleich zu einem Galaktose-Standard bestimmt (○—○—○).

gegenüber 60% HF (16h, 0°C) untersucht. Dabei ergab eine neuerliche Gelfiltration, daß das Oligosaccharid B in ein gleichgroßes Bruchstück und in 3% monomere Galaktose gespalten wurde (nicht dargestellt).

1.11.1. Gegenüberstellung der Oligosaccharide B von A.urea-faciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum, C.ilicis und dem A.aureescens-Oligosaccharid B

Die Oligosaccharide B machten neben monomerer Galaktose den überwiegenden Teil (37-40%) der partiell hydrolysierten Galaktane aus und waren somit ein charakteristischer und vergleichbarer Bestandteil dieser Polysaccharide. Ihre Stokeschen Radien, ihre Hydrolyselabilität, die Reaktion mit D-Galaktose-Oxidase und die im Zuge des Smith-Abbaus erhaltenen Spaltprodukte waren identisch.

Deshalb muß bei den fünf coryneformen Bakterien von einem gleichartigen Aufbau der Oligosaccharide B ausgegangen werden. Sie bestanden zu über 90% aus kettenförmig gebundener (1→2)-Gal_p. Teilweise waren die Bruchstücke durch Gal_f verlängert, was sich in einem uneinheitlichen Elutionsprofil des jeweiligen Gipfels B ausdrückte. Die Stokesche Radien der Oligosaccharide B waren größer als der des Tetrasaccharids Stachyose und dürften 5-6 Galaktoseresten entsprechen.

1.12. Reaktion des A.aureescens-Galaktans mit einem Anti-LsG-Serum

Das A.aureescens Galaktan wurde von Prof.Dr. H.Bretting (Zoologisches Institut, Universität Hamburg) in einem Radioimmunassay mit Hilfe eines Anti-Lymnaea-stagnalis-Galaktan-(Anti-LsG)-Serums auf das Vorhandensein von (1→3)- und/oder (1→6)-Gal_p getestet.

Bei diesem Test wurden 250ng radioaktiv markiertes Lymnaea stagnalis Galaktan, das aus (1→3)- und (1→6)-Gal_p aufgebaut ist (Bretting et al., 1981), eingesetzt, das mit den

entsprechenden Antikörpern eines Anti-LsG-Serums reagierte. Der gebildete Immunkomplex wurde anschließend mit Sepharose 4B gebundenem Protein A ausgefällt. Das A.aurescens-Galaktan wurde in Mengen von 1000-500000ng für Hemmversuche eingesetzt. Dabei konnte absolut keine Hemmung festgestellt werden.

Dies zeigte deutlich, daß die Gal_p -Einheiten des A.aurescens-Galaktans anders als (1→3) oder (1→6) gebunden sein müssen. Dieses Resultat unterstützte die Ergebnisse des Smith-Abbaus und der enzymatischen Oxidation des A.aurescens-Oligosaccharids B_2 (1.10.2.1.) vollständig.

1.13. Struktureller Aufbau der Galaktane

Zusammenfassend lassen sich auf der Basis der erhobenen Befunde zur Struktur der Galaktane von A.aurescens, A.urea-faciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis folgende Aussagen machen:

1. Die Galaktane enthalten Gal_f und Gal_p , wobei das Verhältnis der beiden Galaktose-Konfigurationen in etwa 1:1 ist.
2. Gal_f ist in allen Polysacchariden β -(1→5) oder β -(1→6), Gal_p (1→2) gebunden.
3. Am nicht-reduzierenden Kettenende der Polysaccharide muß sich Gal_f befinden.
4. Das Polysaccharid von C.ilicis unterscheidet sich nur durch das Vorkommen von Glucosamin von den übrigen Galaktanen.
5. Die Stokeschen Radien der isolierten Galaktane sind sehr ähnlich und deuten auf Molekulargewichte von 13000-15000 hin. Dabei sind die furanoide Struktur der Galaktoseeinheiten und mögliche Verzweigungen nicht in Betracht gezogen.

Mögliche Baueinheiten der Galaktane sind am Beispiel des A.aurescens-Galaktans in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

2. Untersuchungen zur Bindungsart von Galaktose in den akzessorischen Zellwandpolymeren von A.globiformis, A.oxydans, C.murisepticum, A.polychromogenes und Arthrobacter sp. DSM 20125

Die Zellwände dieser coryneformen Bakterien, die ebenso wie die vorher untersuchten Organismen taxonomisch zur Gattung Arthrobacter gehören (Stackebrandt und Fiedler, 1979), besitzen neben anderen Zuckern Galaktose als gemeinsamen Bestandteil in den Zellwandpolysacchariden. Ihre Mureine gehören ebenfalls dem Mureintyp A3 α (Schleifer und Kandler, 1972) an, unterscheiden sich aber durch die Zusammensetzung der Interpeptidbrücken von A.aurescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis (Fiedler et al., 1970). Deshalb sollten sich die Strukturuntersuchungen der Zellwandpolysaccharide im wesentlichen auf die Galaktose beschränken und die Frage klären, ob eine Ähnlichkeit zu den bereits untersuchten bakteriellen Galaktanen besteht.

2.1. Chemische Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide

In der hydrolysierten ZWtrp, SDS wurden neben Bestandteilen des Mureins die in Tabelle 10 aufgeführten Zucker und Aminosucker identifiziert.

Tabelle 10: Akzessorische Zellwandkomponenten der Organismen

Organismus	Herkunft	Identifizierte ZW-Komponente	Beschriebene ZW-Komponente	Referenz
A.globiformis	DSM 20124	Gal, Glc	Gal, Glc	b
A.oxydans	DSM 20119	Gal, Glc, DeT, GlcN	Gal, Glc	b
			Gal, Glc, GlcN	c
A.oxydans	DSM 20120	Gal, Glc, DeT, GlcN	Gal, Glc	b
A.polychromogenes	DSM 20136	Gal	Gal	b
			Gal, Glc, GlcN	c
C.murisepticum	ATCC 21374	Gal, Glc, DeT, GlcN	Gal, Glc, DeT, GlcN	c
Arthrobacter sp.	DSM 20125	Gal, GlcN, Rham	Gal, Man, GlcN, Rham	c

Referenzen: b, Keddle und Cure (1977); c, Fiedler (unveröffentlicht)

2.2. Extraktion der akzessorischen Zellwandpolysaccharide

Die akzessorischen Zellwandpolysaccharide wurden mit heißem Formamid (1.3.1) aus der ZWtrp,SDS extrahiert. Mittels der Gaschromatographie konnten alle vor der Extraktion in der ZWtrp,SDS nachgewiesenen akzessorischen Zellwandkomponenten auch im Formamidextrakt bestimmt werden. Das Verhältnis der einzelnen Zucker und Amino Zucker zueinander war im Formamidextrakt das gleiche wie in der ZWtrp,SDS. Auf Grund der sehr niedrigen Phosphat-Gehalte (Tabelle 11) war eine glykosidische Bindung der Zucker und Amino Zucker anzunehmen. Teichonsäuren waren auszuschließen, was auch durch das Fehlen von Polyolen wie Glycerin, Ribit, Erythrit und Mannit angezeigt war.

2.3. Gelfiltration der Polysaccharide mit Sephacryl S-300 sf

Die Elutionsprofile der Organismen wurden bei der Gelfiltration mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode ermittelt. Als Beispiel ist das Elutionsprofil des A.globiformis-Polysaccharids in Abbildung 16 dargestellt.

Alle durch Formamid extrahierten Polysaccharide eluierten mit einem Gipfel von der Säule. Zur weiteren Kontrolle wurden

Tabelle 11: Chemische Zusammensetzung der Formamidextrakte

Organismus	Komponenten der Formamidextrakte					
	$\mu\text{molGal/mg}$	$\mu\text{molGlc/mg}$	$\mu\text{molP}_i/\text{mg}$	DeT	GlcN	Rham
A.globiformis	0.6	0.2	0.03	-	-	-
A.oxydans DSM 20119	0.4	1.3	0.07	+	+	-
A.oxydans DSM 20120	0.4	1.2	0.08	+	+	-
C.murisepticum	0.5	1.2	0.06	+	+	-
Arthrobacter sp.	1.4	-	0.02	-	+	+
A.polychromogenes	2.0	-	0.03	-	-	-

+/-, Zucker vorhanden/nicht vorhanden; Herkunft der Organismen siehe Tabelle 10.

aus dem ansteigenden und dem abfallenden Ast des Elutionsprofils je zwei Fraktionen gaschromatographisch untersucht. In den Fraktionen des jeweiligen Polysaccharids war eine identische qualitative und quantitative Verteilung der Zucker bzw. Aminozucker wie vor dem Auftrag auf die Säule vorhanden, so daß jeweils von einem einheitlichen Polysaccharid ausgegangen werden konnte.

Die Stokeschen Radien der Polysaccharide von A. oxydans, A. globiformis, C. murisepticum und Arthrobacter sp. waren etwas größer als der des A. aurescens-Galaktans (Abbildung 17). Das Polysaccharid von A. polychromogenes, das Galaktose als einzige Zuckerkomponente enthielt, besaß jedoch den gleichen Stokeschen Radius wie das A. aurescens-Galaktan.

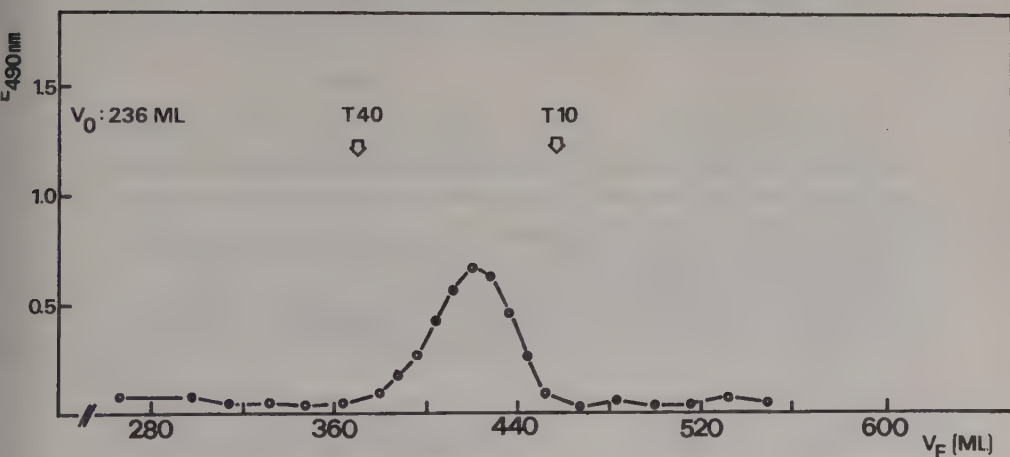


Abbildung 16: Gelfiltration des Formamidextrakts von A. globi-
formis

Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurde der Neutralzucker-Gehalt (○—○—○) mittels der Phenol-Schwefelsäure-Methode ermittelt. Bedingungen der Gelfiltration siehe Abbildung 6.

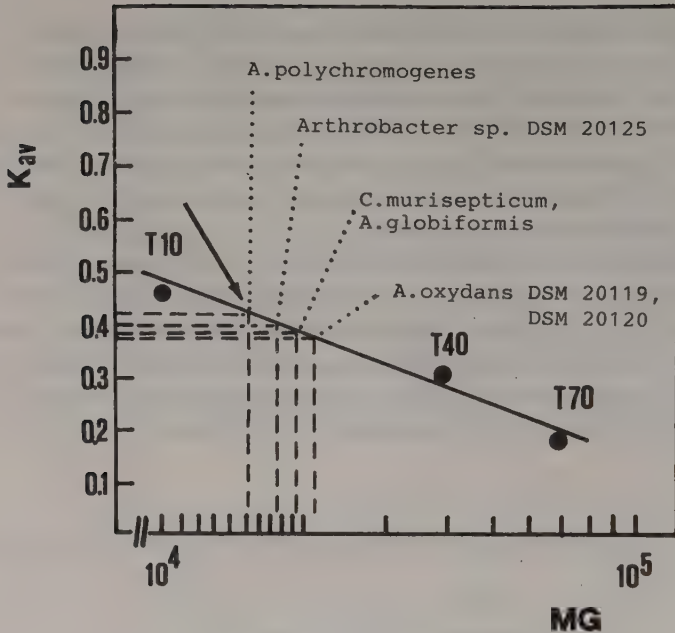


Abbildung 17: Gelfiltration der extrahierten Polysaccharide

Die Polysaccharide von *A. oxydans* DSM 20119 und DSM 20120, *C. murisepticum*, *A. globiformis*, *Arthrobacter* sp. DSM 20125 und *A. polychromogenes* wurden an einer zuvor mit den Dextranen T10, T40 und T70 geeichten Sephacryl S-300 Säule chromatographiert. (◆) Galaktan von *A. aureus*. Bedingungen der Gelfiltration siehe Abbildung 6.

2.4. Hydrolyselabilität der extrahierten Polysaccharide

Bei einem Vergleich des *A. aureus*-Galaktans mit den Polysacchariden von *A. globiformis*, *A. oxydans*, *C. murisepticum*, *Arthrobacter* sp. und *A. polychromogenes* stellte die Untersuchung der Säurehydrolyselabilität das Kriterium für eine Aussage über das mögliche Vorkommen und den ungefähren Anteil von Gal_f im Polysaccharid dar (Tabelle 12).

Das *A. polychromogenes*-Polysaccharid, das ebenso wie das

A.aureescens-Galaktan Galaktose als einzige Zuckerkomponente enthält, war verglichen mit diesem deutlich hydrolyse-labiler gegenüber 60% HF. Die übrigen Daten ließen außerdem die Feststellung zu, daß in allen sechs untersuchten Polysacchariden Gal_f vorhanden sein mußte.

Aus den beiden A.oxydans-Polysacchariden und dem C.murisepticum-Polysaccharid wurden durch 60% HF (0°C, 16h) sowie durch 0.01M HCl (100°C, 1h) neben Galaktose ein geringer Prozentsatz der Glucose (10-15% durch 0.01M HCl) freigesetzt. Dies muß an einer engen Nachbarschaft der Gal_f mit einem Teil der Glucose innerhalb der Polysaccharide begründet liegen. Zusätzlich wurden bei den oben genannten Polysacchariden durch 60% HF ein geringer Anteil 6-Desoxy-Talose abgespalten. Gleiches geschah mit einem kleinen Prozentsatz der Rhamnose des Arthrobacter sp.-Polysaccharids. Dieses Verhalten beruht auf der erhöhten Säurehydrolyselabilität von 6-Desoxy-Hexosen gegenüber Hexosen.

Tabelle 12: Galaktose Freisetzung aus den Polysacchariden durch Hydrolyse mit 0.01M HCl und 60% HF

Organismus/Polysaccharid	Hydrolyserate der Gal in %	
	0.01M HCl 100°C, 1h	60% HF 0°C, 16h
A.globiformis-Polysaccharid	28.7	69.0
A.oxydans DSM 20119 und DSM 20120 Polysaccharid	11.0	78.0
C.murisepticum-Polysaccharid	15.0	77.6
Arthrobacter sp.-Polysaccharid	13.0	52.7
A.polychromogenes-Galaktan	30.5	70.8
A.aureescens-Galaktan	21.2	52.0

Die Hydrolyserate gibt den prozentualen Anteil freigesetzter Galaktose bezogen auf die eingesetzte Galaktose-Menge des Polysaccharids an.

2.5. Perjodat-Oxidation der bakteriellen Polysaccharide

Die Perjodat-Oxidationen wurden mit den extrahierten Polysacchariden, wie unter 1.6. beschrieben, durchgeführt.

2.5.1. Perjodat-Oxidation mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung

Da in den untersuchten bakteriellen Polysacchariden nur Hexosen, 2-Desoxy-2-Amino-Hexosen und 6-Desoxy-Hexosen vorkamen, konnte gebildeter Formaldehyd nur aus Gal_f mit freien Hydroxyl-Gruppen am C₅- und C₆-Kohlenstoffatom entstanden sein.

Aus den in Tabelle 13 aufgeführten Polysacchariden wurde, im Vergleich zum A.aurescens-Galaktan, durch Perjodat wesentlich mehr Formaldehyd gebildet. Diese hohe Formaldehyd Freisetzung läßt zwei Deutungen zu, entweder ist ein Großteil der Gal_f (1→2) und/oder (1→3) gebunden, oder es liegt eine (1→5) und/oder (1→6) Bindung vor, wobei die Polysaccharide mehrere Verzweigungen oder Seitenketten enthalten müssen und Gal_f an den nicht-reduzierenden Kettenenden gebunden ist. Dies war, wenn überhaupt, durch einen

Tabelle 13: Perjodat-Oxidation mit anschließender Formaldehyd-Bestimmung der extrahierten Polysaccharide

Organismus/Polysaccharid	nmol Formaldehyd/100nmol Galaktose
A.globiformis-Polysaccharid	14.3
A.oxydans DSM 20119 und DSM 20120 Polysaccharid	51.0
C.murisepticum-Polysaccharid	33.7
Arthrobacter sp.-Polysaccharid	82.0
A.polychromogenes-Galaktan	64.5
A.aurescens-Galaktan	6.2

Smith-Abbau der Polysaccharide zu klären.

2.5.2. Smith-Abbau der Polysaccharide

Der Smith-Abbau wurde, wie unter 1.6.2. beschrieben, vorgenommen. Zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen wurde das Glykopeptid von Penicillium charlesii mitgeführt. Von jeder Probe wurde nach Oxidation mit Perjodat und anschließender Reduktion neben der milden Hydrolyse des Smith-Abbaus eine Hydrolyse mit 2M HCl (100°C, 3h) durchgeführt. Damit wurden nicht gespaltene Neutral- und Aminosucker erfaßt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Eine Interpretation der Resultate der Perjodat-Oxidationen soll für jedes bakterielle Polysaccharid einzeln vorgenommen werden.

2.6. Charakterisierung der bakteriellen Zellwandpolysaccharide

Das Polysaccharid von A.globiformis DSM 20124

Das extrahierte Polysaccharid bestand aus Galaktose und

Tabelle 14: Beim Smith-Abbau erhaltene Zuckeralkohole, Zucker und Aminosucker der extrahierten Polysaccharide

Polysaccharid von Organismus	Durch Smith-Abbau erhaltene Zucker, Zuckeralkohole				Durch Perjodat-Oxidation nicht od. nur teilweise gespaltene Hexosen				
	Gro	Ert	Tht	Ara	Rha	DeT	Gal	Glc	GlcN
A.globiformis	+		+	+				+	
A.oxydans									
DSM 20119/20120	+	+	+	+		+			+
C.murisepticum	+	+	+	+		+			+
Arthrobacter sp.	+			+	+		+		+
A.polychromogenes	+		+	+			+		

Glucose. Durch den Smith-Abbau wurde das Polysaccharid in Glycerin, Threit, Arabinose und Glucose gespalten. Wegen der Säurehydrolyselabilität der Galaktosebindung, des Nachweises von Formaldehyd nach Perjodat-Oxidation und der Bildung von Arabinose beim Smith-Abbau, muß das Polysaccharid Gal_f enthalten. Auf Grund des Ergebnisses der Hydrolyselabilität gegenüber 60% HF sollte über die Hälfte der vor kommenden Galaktose als Gal_f gebunden sein. Bei der Perjodat-Oxidation wurden aber nur aus 15% der vorhandenen Galaktose Formaldehyd freigesetzt, so daß eine (1→5) und/oder (1→6) Bindung einer (1→2) und/oder (1→3) Bindung der Gal_f vorzuziehen ist.

Ähnlich dem Galaktan von A.aureescens besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der Galaktose in pyranoider Ringform vorhanden ist.

Die Polysaccharide von A.oxydans DSM 20119 und DSM 20120 und von C.murisepticum ATCC 21374

Die Polysaccharide ähneln sich nicht nur in ihrer Zusammensetzung (Gal, Glc, DeT, GlcN), sondern auch in ihrem Verhalten beim Smith-Abbau. Glucosamin und 6-Desoxy-Talose konnten bei allen drei Polysacchariden durch Perjodat nicht oxidiert werden. Glucosamin liegt deshalb in (1→3) oder (1→4) glykosidischer Bindung oder mehrfach gebunden vor. 6-Desoxy-Talose könnte nur dann von Perjodat gespalten werden, wenn sie ausschließlich (1→2) gebunden wäre.

Glucose ist in den Polysacchariden (1→4) glykosidisch verknüpft, da beim Smith-Abbau Erythrit als Spaltprodukt erhalten wurde.

Mindestens 51% der Galaktose der A.oxydans-Polysaccharide und 34% der Galaktose des C.murisepticum-Polysaccharids müssen auf Grund der Perjodat-Oxidation/Formaldehyd-Bestimmung in furanoider Ringform gebunden sein. Eine Aussage über die glykosidische Bindung der Galaktose ist wegen der komplexen Zusammensetzung und der möglichen Verzweigung der Polysac-

charide nicht möglich.

Das Polysaccharid von Arthrobacter sp. DSM 20125

Glucosamin und Rhamnose (6-Desoxy-Mannose) des Polysaccharids wurden durch Perjodat nicht oxidiert. Deshalb kann Glucosamin nicht ausschließlich (1→6) glykosidisch gebunden sein. Rhamnose kann in jeder glykosidischen Bindung außer einer alleinigen (1→2) Bindung vorkommen.

Da bei der Perjodat-Oxidation aus 82% der im Polysaccharid vorkommenden Galaktose Formaldehyd abgespalten wurde und beim Smith-Abbau nur Arabinose und Glycerin nachgewiesen wurden, sind zumindest 82% der Galaktose dieses Polysaccharids als (1→2)- und/oder (1→3)-Gal_f gebunden.

Das Polysaccharid von A. polychromogenes DSM 20136

A. polychromogenes hat wie A. aurescens ein Zellwandpolysaccharid, das nur aus Galaktose besteht. Im direkten Vergleich der beiden Polysaccharide war das A. polychromogenes-Galaktan etwas hydrolyselabiler als jenes von A. aurescens, aus dem wiederum, im Gegensatz zum A. polychromogenes-Galaktan, durch Inkubation mit exo-β-Galaktofuranosidase Galaktose abgespalten werden konnte (2.7.). Am stärksten unterscheiden sich die beiden Galaktane bei der Perjodat-Oxidation. Aus dem A. polychromogenes-Galaktan wurden durch Perjodat-Oxidation 64nmol Formaldehyd pro 100nmol Galaktose freigesetzt, aus dem A. aurescens-Galaktan nur 6.2nmol. Beim Smith-Abbau des A. polychromogenes-Galaktans wurde überwiegend Arabinose gebildet.

Aus diesen Unterschieden wurde deutlich, daß sich das A. polychromogenes-Galaktan vom A. aurescens-Galaktan strukturell unterscheidet. Während im Falle des A. aurescens-Galaktans Gal_f (1→5) und/oder (1→6) gebunden vorkommt, ist im A. polychromogenes-Galaktan die bevorzugte Bindung von Gal_f offenbar (1→2) und/oder (1→3).

2.7. Enzymatische Hydrolyse von Galaktose durch $\text{exo-}\beta$ -Galaktofuranosidase

Durch Inkubation der extrahierten Polysaccharide von A.globiformis, Arthrobacter sp., C.murisepticum, A.oxydans und A.polychromogenes konnte in keinem Fall Galaktose freigesetzt werden. Demzufolge muß angenommen werden, daß im Gegensatz zu den vorher untersuchten Galaktanen keine β -(1 $\rightarrow$ 5) und/oder β -(1 $\rightarrow$ 6) gebundene terminale Gal_f vorkommt.

3. Untersuchung der akzessorischen Zellwandpolymere von Rothia dentocariosa NCTC 10917, Rothia dentocariosa NCTC 10207 und Vergleich mit den Galaktanen der Arthrobacter-Vertreter

Georg und Brown (1967) haben bei einigen R.dentocariosa-Stämmen Galaktose als Zellwandkomponente nachgewiesen. Demgegenüber fordert Hammond (1970a), nach einer Untersuchung mehrerer R.dentocariosa-Stämme unterschiedlicher Herkunft, ein Fructose enthaltendes Zellwand-Antigen für die Gattung Rothia.

3.1. Chemische Zusammensetzung der Zellwände

In den Zellwänden von R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 konnte Galaktose als Zellwandbestandteil bestimmt werden. Desweiteren war in beiden Zellwänden zusätzlich zu den Komponenten des Mureins ein Aminozucker vorhanden (Tabelle 15 und 16). Fructose konnte weder in den Zellwänden von R.dentocariosa NCTC 10917 noch bei R.dentocariosa NCTC 10207 ermittelt werden. Der Phosphat-Gehalt der ZWtrp lag unter 1%, so daß Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere auszuschließen waren.

3.2. Extraktion der Zellwandpolysaccharide

Die Polysaccharide wurden unter der Einwirkung von heißem Formamid (1.3.1.) von den Zellwänden getrennt. Die qualitative Zusammensetzung der Formamidextrakte ist in Tabelle 16

Tabelle 15: Aminosäuren- und Aminosucker-Zusammensetzung der Zellwände von R.dentocariosa vor und nach Formamidbehandlung

Stamm/Herkunft	Formamid-behandlung	Mol-Verhältnis						
		Glu	Lys	Ala	Mur	GlcN	GalN	od. ManN [*]
R.dentocariosa NCTC 10917	-	1.0	1.2	3.1	1.2	2.9	-	-
R.dentocariosa NCTC 10207	-	1.0	1.0	3.0	0.9	0.9	0.6	-
R.dentocariosa NCTC 10917	+	1.0	1.1	2.9	1.3	1.5	-	-
R.dentocariosa NCTC 10207	+	1.0	1.0	2.7	1.2	1.2	0.1	-

Formamidbehandlung -/+, Analyse der ZWtrp vor/nach Formamidextraktion; *, berechnet als GalN.

Tabelle 16: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der extrahierten Polysaccharide von R.dentocariosa

Stamm/Herkunft	Komponenten (µmol/mg)				
	Gal	GlcN	GalN oder	ManN [*]	P _i
R.dentocariosa NCTC 10917	1.7	1.2	-	-	0.08
R.dentocariosa NCTC 10207	2.3	-	0.5	-	0.09

*, berechnet als GalN; die Werte wurden nach Hydrolyse enzymatisch und mit Hilfe des Aminosäurenanalysators ermittelt, Phosphat wurde colorimetrisch bestimmt.

aufgeführt. Um den homogenen Aufbau der Polysaccharide zu überprüfen, wurde eine Gelfiltration unternommen.

3.3. Gelfiltration der Polysaccharide mit Sephacryl S-300 sf

Die beiden Polysaccharide wurden nacheinander auf eine Sephacryl S-300 Säule aufgetragen. Sie eluierten jeweils ohne Auftrennung mit gleichmäßig ansteigendem und abfallendem Zucker-Gehalt von der Säule (nicht dargestellt). Beide Polysaccharide hatten ein identisches Elutionsvolumen. Der Verteilungskoeffizient (K_{av}) betrug 0.39. Der Stokesche Radius war größer als der des Dextrans T10 (K_{av} 0.47) und der des A. aurescens-Galaktans (K_{av} 0.43). Eine gaschromatographische Kontrolle ausgewählter Fraktionen des an- und absteigenden Astes des Elutionsgipfels ergab ein gleiches Verhältnis von Galaktose zum jeweiligen Aminozucker wie in der Probe vor dem Auftragen, so daß auf einen einheitlichen Aufbau der beiden Polysaccharide geschlossen werden konnte.

3.4. Hydrolyselabilität der glykosidischen Bindung von Galaktose in den Polysacchariden

Eine Untersuchung der Säurehydrolyselabilität der Polysaccharide sollte klären helfen, in welcher Ringform die Galaktose in diesen Polysacchariden vorliegt. Als Kriterium für die Hydrolyselabilität wurde wieder die Freisetzung monomerer Galaktose durch eine Hydrolyse mit 0.01M HCl (100°C, 1h) und 60% HF (0°C, 16h) gewählt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Hydrolyserate von Galaktose in den Polysacchariden von R. dentocariosa

Polysaccharid von Stamm/Herkunft	Hydrolyserate (Gal) in %	
	0.01M HCl, 100°C, 1h	60% HF, 0°C, 16h
R.dentocariosa NCTC 10917	19.0	100.0
R.dentocariosa NCTC 10207	14.0	54.0

Die Hydrolyserate der Polysaccharide bezeichnet den, durch die jeweilige Hydrolyse, freigesetzten Anteil monomerer Galaktose.

Die Hydrolyselabilität der Galaktose innerhalb der Polysaccharide von R.dentocariosa war deutlich höher als die der aus Gal_p aufgebauten Galaktane aus Schnecken (Tabelle 6). Dies war ein Hinweis auf das Vorkommen von Gal_f. Zur genaueren Analyse der Bindungsart wurde eine Perjodat-Oxidation durchgeführt.

3.5. Smith-Abbau der extrahierten Polysaccharide

Der Smith-Abbau wurde, wie unter 1.6.2. beschrieben, vorgenommen.

Die Polysaccharide von R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 unterschieden sich nicht in der Zusammensetzung der Spaltfragmente des Smith-Abbaus. Gaschromatographisch wurde übereinstimmend Glycerin, Threitol, Arabinose und Galaktose nachgewiesen. Damit hatten die beiden Polysaccharide von R.dentocariosa ein ähnliches Spaltungsmuster wie das A.aurescens-Galaktan und das Glykopeptid von Penicillium charlesii (1.6.2.). Die Aminozucker der beiden extrahierten Polysaccharide wurden durch Perjodat nicht oxidiert. Für die Spaltfragmente der R.dentocariosa-Polysaccharide beim Smith-Abbau gelten die bei der Untersuchung des A.aurescens-Galaktans gemachten Interpretationen.

Die hohe Säurehydrolyselabilität der gebundenen Galaktose, der Nachweis von Arabinose und Threitol sowie die Freisetzung von 6.4 bzw. 4.5nmol Formaldehyd/100nmol Galaktose nach Perjodat-Oxidation sind ein klares Indiz für Gal_f. Dabei ist auf Grund der geringen Freisetzung von Formaldehyd (1.6.1.) nach Perjodat-Oxidation und dem Auftreten von Threitol nach Smith-Abbau eine (1→5) oder (1→6) glykosidisch gebundene Gal_f anzunehmen.

R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 besitzen demnach Polysaccharide als akzessorische Zellwandkomponenten, deren gemeinsames Merkmal das Vorkommen von Galaktose und die furanoide Ringform der gebundenen Galak-

tose sind. Eine Gegenüberstellung der Polysaccharide von R. dentocariosa mit jenen der Arthrobacter-Vertreter zeigte, daß sie sich nicht nur wegen der identischen Zusammensetzung ihrer Polysaccharide sehr ähneln, sondern sich auch in ihren Stokeschen Radien, in ihrem Verhalten gegenüber Natriumperjodat und in ihrer Säurehydrolselabilität gleichen.

4. Untersuchung des Aufbaus und der glykosidischen Bindung von Galaktose der akzessorischen Zellwandpolymere von Brevibacterium casei und Brevibacterium epidermidis

Für die beiden neu beschriebenen Organismen Brevibacterium casei und Brevibacterium epidermidis wurde von Collins et al. (1983) Galaktose als charakteristischer Bestandteil von akzessorischen Zellwandpolysacchariden angegeben. Für das Vorhandensein von Zellwandteichonsäuren, die für die anderen Vertreter der Gattung Brevibacterium beschrieben wurden (Fiedler et al., 1981; Anderton und Wilkinson, 1980) und als Gattungsmerkmal anzusehen sind (Fiedler et al., 1981), werden aber keine Hinweise geliefert. Die strukturelle Rolle von Galaktose war deshalb auch in diesen Fällen von Interesse.

4.1. Chemische Zusammensetzung der Zellwände

Neben der von Collins et al. (1983) als Zellwandkomponente beschriebenen Galaktose konnten bei B. casei und B. epidermidis weitere Zucker, Zuckeralkohole und Aminosucker in den Zellwänden bestimmt werden (Tabelle 18 und 19).

Auffallend war, daß der Phosphat-Gehalt der ZWtrp von B. casei 13.3%, der von B. epidermidis 12.3% betrug und damit deutlich höher war als z.B. jener von A. aurescens (0.6%). Diese hohen Phosphat-Gehalte der ZWtrp wiesen auf das Vorliegen von Zellwandteichonsäuren hin. Darauf wurde auch die Extraktion der akzessorischen Zellwandpolymere ausgerichtet.

Tabelle 18: Aminosäuren- und Aminosucker-Zusammensetzung der ZWtrp von B.casei und B.epidermidis

Stamm	Glu	m-Dpm	Mol-Verhältnis				GalN od. ManN *
			Ala	Mur	GlcN		
B.casei	1.0	1.0	2.1	1.2	1.4		1.2
B.epidermidis	1.0	1.0	1.9	1.1	1.7		-

*, berechnet als GalN

Tabelle 19: Chemische Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide von B.casei und B.epidermidis

Stamm	Komponenten
B.casei	Galaktose*, Glycerin, Glucose, Glucosamin, Galaktosamin oder Mannosamin, Phosphat
B.epidermidis	Galaktose*, Glycerin, Mannit, Glucosamin, Phosphat

*, Galaktose wurde von Collins et al. (1983) als Zellwandkomponente beschrieben; die angegebenen Komponenten wurden nach Hydrolyse gaschromatographisch bzw. colorimetrisch ermittelt.

4.2. Extraktion der Zellwandpolysaccharide

Zur Extraktion der Zellwandpolysaccharide wurden die ZWtrp mit 5% Trichloressigsäure 24h bei 4°C gerührt (Perkins, 1963). Der wasserlösliche, phosphathaltige Extrakt wurde von den Zellwänden abgetrennt und mit Äthanol präzipitiert (TCA-Extrakt). Die TCA-Extrakte enthielten die in Tabelle 19 beschriebenen Komponenten. Bestandteile des Mureins waren

nicht feststellbar.

Um die Homogenität der Phosphat enthaltenden TCA-Extrakte zu überprüfen, wurden diese an DEAE-Sephacel-Säulen chromatographiert.

4.3. Chromatographie der TCA-Extrakte an DEAE-Sephacel

Der TCA-Extrakt von B.casei eluierte bei einem Salz-Gehalt von 0.4M NaCl mit einem Phosphat-Maximum, das alle in Tabelle 19 aufgeführten Komponenten enthielt, von der DEAE-Sephacel-Säule. Der TCA-Extrakt von B.epidermidis wurde durch den linearen NaCl-Gradienten mit zwei Phosphat-Maxima (0.28M NaCl und 0.33M NaCl) von dem Anionenaustauscher abgelöst (Abbildung 18). Peak A enthielt neben Phosphat, Glycerin, Mannit, Galaktose und Glucosamin. Peak B wies neben Phosphat, Glycerin und Mannit auf. Diese uneinheitliche Elution des TCA-Extrakts mit zwei Phosphat-Maxima läßt auf zwei unterschiedlich aufgebaute Polymere in der Zellwand von B.epidermidis schließen.

4.4. Gelfiltration der TCA-Extrakte nach HF-Hydrolyse mit Bio-Gel P-2

Um den strukturellen Aufbau der Polysaccharidkette untersuchen zu können, wurde der TCA-Extrakt zur Spaltung der Phosphoester-Bindungen einer HF-Hydrolyse unterzogen. Daran schloß sich eine Gelfiltration der erhaltenen Bruchstücke mit Bio-Gel P-2 an.

4.4.1. Untersuchung der Spaltprodukte von B.casei

Der mit HF hydrolysierte TCA-Extrakt ließ sich in fünf Bruchstücke mit unterschiedlichem Elutionsvolumen trennen (Tabelle 20).

Bruchstücke A,B und C waren Monomere, nämlich Glucose, N-Acetyl-Glucosamin und Glycerin. Das Mol-Verhältnis der Kompo-

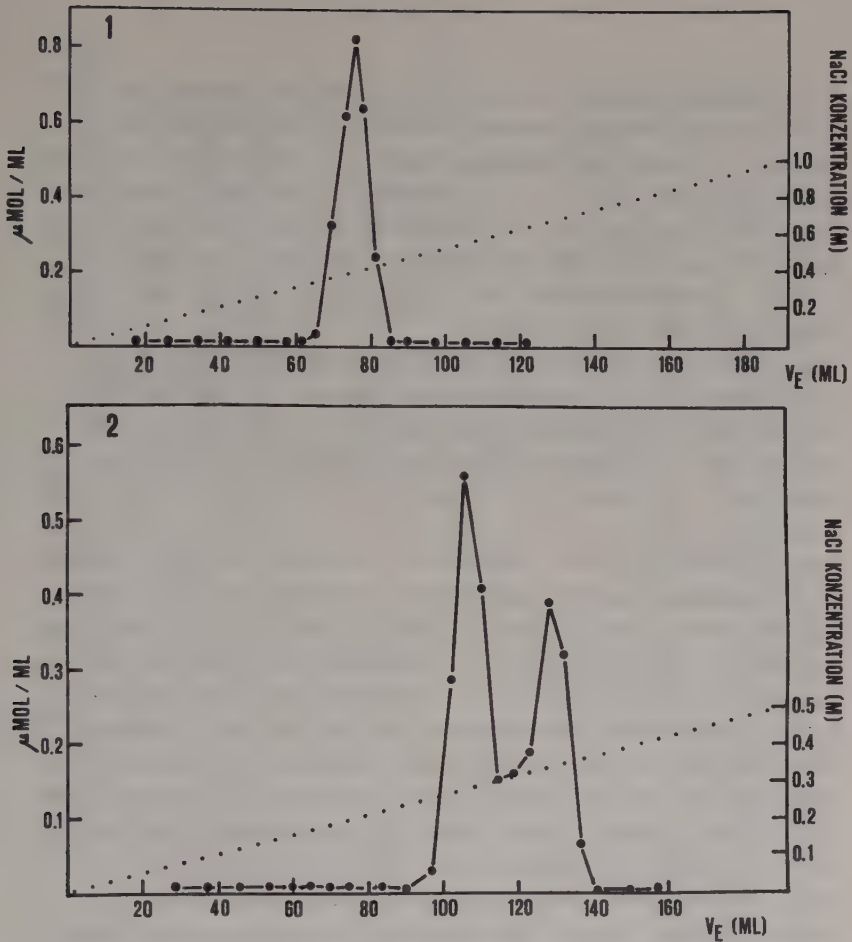


Abbildung 18: Chromatographie der TCA-Extrakte von *B. casei* (1) und *B. epidermidis* (2) an DEAE-Sephacel

Die TCA-Extrakte ($11 \mu\text{mol } P_i$) wurden auf $15.0 \times 1.7 \text{ cm}$ DEAE-Sephacel-Säulen aufgetragen.¹ Die Säulen wurden zur Entfernung nicht-gebundenen Materials mit einem Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl , pH 7.0, gewaschen. Die gebundenen TCA-Extrakte wurden mit linearen NaCl-Gradienten (.....) eluiert. Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml (15 min) wurden gesammelt. Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurde der Phosphat-Gehalt (P_i) (●—●—●) bestimmt.

nenten des Bruchstücks D war Glycerin/Galaktose/Glucose wie 2/1/1. Dieses für die Gaschromatographie peracetylierte Bruchstück konnte gaschromatographisch in zwei Bestandteile getrennt werden, die die gleichen Retentionszeiten wie $0-\alpha\text{-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-Gro}$ aus der Teichonsäure von Bacillus subtilis DSM 10 (Glaser und Burger, 1964) und $0-\alpha\text{-Gal}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-Gro}$ aus der Lipoteichonsäure von Streptococcus lactis NCDO 712 (Fischer et al., 1980) hatten.

Eine Inkubation des Bruchstücks D mit den Glykohydrolasen α -Glucosidase und α -Galaktosidase führte zur Freisetzung von Glucose bzw. Galaktose. Aus diesen Ergebnissen ergaben sich für die zwei Bestandteile des Bruchstücks D folgende Strukturen: $0-\alpha\text{-D-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-Gro}$ und $0-\alpha\text{-D-Gal}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-Gro}$.

Das Mol-Verhältnis der Komponenten des Bruchstücks E, dessen Elutionsvolumen geringfügig kleiner, als das des Tetrasaccharids Stachyose war, betrug Glycerin/Glucose/Galaktosamin oder Mannosamin wie 1.0/0.8/0.9. Der Aminozucker wurde als Galaktosamin berechnet. Geht man bei dem Bruchstück E davon aus, daß der Aminozucker N-acetyliert vorlag und sich damit der Stokesche Radius des N-Acetyl-Aminozuckers im Vergleich zu einer Hexose bei der Gelfiltration verdoppelt (Yamashita et al., 1982), konnte es sich trotz des geringeren Elutionsvolumens bezogen auf Stachyose, um ein Trisaccharid aus Glycerin, Glucose und dem N-Acetyl-Aminozucker (GalN oder ManN) gehandelt haben. Eine weitere Charakterisierung des Bruchstücks E wurde nicht durchgeführt. Möglicherweise handelte es sich dabei um die Anbindungsregion der Teichonsäurekette an das Murein.

4.4.2. Untersuchung der Spaltprodukte von B.epidermidis

Der HF-hydrolisierte TCA-Extrakt von B.epidermidis ließ sich bei der Gelfiltration in zwei Bruchstücke aufgliedern (Tabelle 20).

Mit der Gaschromatographie waren die Bruchstücke F und G

Tabelle 20: Gelfiltration der HF-hydrolysierten TCA-Extrakte von B.casei und B.epidermidis und Untersuchung der erhaltenen Bruchstücke. Aliquots jeder bzw. jeder zweiten Fraktion wurden, falls erforderlich, hydrolysiert und gaschromatographisch analysiert.

Stamm	Bruchstück	V _E (ml)	Hydrolyse des Bruchstücks nach der Gelfiltration	Nachweismethode	Komponenten des Bruchstücks	Struktur des Bruchstücks
B.casei	A	136	-	GC, E	Glc	Glc
	B	131	-	GC, E	Gro	Gro
	C	127	-	GC, M-E	GlcNac	GlcNac
	D	125	+	GC, E	Gro, Gal, Glc	α -D-Glc _P -(1 $\rightarrow$ 2)-Gro, α -D-Gal _P -(1 $\rightarrow$ 2)-Gro
	E	110	+	GC, E	Gro, Glc, ManN oder GalN	Gro+Glc+ManN od. GalN
B.epidermidis	F	130	-	GC, E	Man(OH), Gro	Man(OH), Gro
	G	126	+	GC, E	Gro, Gal, GlcN	α -D-Gal _P -(1 $\rightarrow$ 2)-Gro,
			-	M-E	GlcNac	GlcNac

Hydrolyse +/-, 2M HCl, 100°C, 3h/keine Hydrolyse;

Nachweismethoden: GC, Gaschromatographie; E, enzymatischer Nachweis; M-E, Morgan-Elson-Test; V_E(ml), Elutionsvolumen; V₀ 66ml; authentische Referenzen: Gal 137ml, Mannit (Man(OH)) 130ml,

Raffinose 116ml; Stachyose 112ml; Bedingungen der Gelfiltration an Bio-Gel P-2 siehe II 7.1.1.

nach Acetylierung der entsprechenden Fraktionen in weitere Bestandteile auftrennbar. An Hand der Retentionszeiten und der Cochromatographie konnten folgende Verbindungen ermittelt werden:

Bruchstück F bestand aus Glycerin und Mannit, wobei die Zuckeralkohole auf Grund ihres Elutionsvolumens bei der Gel-filtration monomer vorlagen;

Bruchstück G enthielt neben freiem N-Acetyl-Glucosamin, das Glykosid $O-\alpha-D-Gal_p-(1\rightarrow2)-Gro.$ N-Acetyl-Glucosamin ließ sich auch durch den Morgan-Elson Test bestimmen, α -Galaktosyl-Glycerin konnte außer durch die Gaschromatographie auch auf Grund des Mol-Verhältnisses der Komponenten des Bruchstücks G und der Freisetzung von Galaktose nach Inkubation mit α -Galaktosidase definiert werden.

4.5. Mol-Verhältnisse der einzelnen Komponenten der Polysaccharide

Eine Gegenüberstellung des Mol-Verhältnisses von Phosphat und der durch HF freigesetzten Komponenten des jeweiligen Polysaccharids sollte klären, ob alle durch HF-Hydrolyse gewonnenen Bruchstücke kettenartig über Phosphoester gebunden waren. Dazu wurden die quantitativ bestimmten Zuckeralkohole, Zucker und Aminosucker nach HF- und nach aufeinanderfolgender HF-/HCl-Hydrolyse dem jeweiligen Phosphat-Gehalt der Probe gegenübergestellt.

Die Quantifizierung erfolgte direkt aus der ZWtrp, um eine zweimalige schwache Hydrolyse (TCA und HF) glykosidischer Bindungen zu vermeiden. Glykosidische Bindungen des Mureins wurden durch HF nicht hydrolysiert.

Das Mol-Verhältnis von Phosphat zu den durch HF-Hydrolyse erhaltenen Bruchstücken war bei B.casei und B.epidermidis etwa 1:1 (Tabelle 21). Glycerin und glykosidisch substituiertes Glycerin machten den überwiegenden Teil der HF-Hydrolysate aus. B.casei und B.epidermidis haben deshalb Zellwandpolysaccharide, die teilweise substituierten Polyglycerinphosphat-

ketten entsprechen. B.epidermidis hat auf Grund der Freisetzung von Mannit nach HF-Hydrolyse und der Mol-Verhältnisse Poly-(Mannitphosphat)-Ketten ans Murein gebunden. Dies zeigte auch die unterschiedliche Affinität zweier Poly-(Zuckeralkoholphosphat)-Ketten zu dem Anionenaustauscher DEAE-Sephacel (Abbildung 18).

B.casei und B.epidermidis besitzen somit Teichonsäuren des Poly-(Glycerinphosphat)-Typs (Baddiley, 1970), B.epidermidis zusätzlich noch des Poly-(Mannitphosphat)-Typs (Anderton und Wilkinson, 1980; Fiedler et al., 1981).

Als gemeinsames Strukturmerkmal enthielten die Teichonsäuren von B.casei und B.epidermidis α -Galaktosylglycerin.

Die Galaktose lag in beiden Teichonsäuren wegen der geringen Hydrolyselabilität gegenüber 60% HF (10-12%) und der enzymatischen Hydrolyse mit α -Galaktosidase als Gal_p vor.

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Mol-Verhältnisse von Phosphat und der über Phosphoester gebundenen Bestandteile der Teichonsäuren von B.casei und B.epidermidis

Stamm	Komponenten der Teichonsäuren	Mol-Verhältnis
B.casei	Phosphat (P _i)	=1.0
	Glycerin	0.15
	Glucose	0.16
	N-Acetyl-Glucosamin	0.3
	0- α -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-Gro	0.08
	0- α -D-Glc _p -(1 $\rightarrow$ 2)-Gro	0.2
	"Trisaccharid" Gro+Glc+GalNAc oder ManNAc *	0.1
B.epidermidis	Phosphat(P _i)	=1.0
	Glycerin	0.25
	Mannit	0.4
	N-Acetyl-Glucosamin	0.2
	0- α -D-Gal _p -(1 $\rightarrow$ 2)-Gro	0.4

*, berechnet als GalNAc

5. Untersuchung der Galaktose enthaltenden akzessorischen Zellwandpolysaccharide von Pimelobacter simplex DSM 20130 und Pimelobacter simplex NCIB 9770

Für Pimelobacter simplex DSM 20130, den Typstamm der Spezies, wurde von Keddie und Cure (1977) Galaktose als akzessorische Zellwandkomponente beschrieben.

5.1. Zellwändepräparation

Im Gegensatz zu den in Teil 1 und 2 untersuchten coryneformen Bakterien wurden die tryptisch gereinigten Zellwände von P. simplex keiner Extraktion mit heißem SDS unterworfen.

5.2. Chemische Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide

Die akzessorischen Zellwandkomponenten von P. simplex DSM 20130 und P. simplex NCIB 9770 sind in Tabelle 22 wiedergegeben. Im Gegensatz zu den von Keddie und Cure (1977) beschriebenen Befunden wurden neben Galaktose noch Rhamnose und Glucosamin bzw. Mannose und Glucosamin nachgewiesen. Darüber hinaus waren neben den Polyolen Glycerin und Ribit bzw. Glycerin noch Phosphat und Sulfat vorhanden.

5.3. Extraktion des Zellwandpolysaccharids von P. simplex DSM 20130

Das Zellwandpolysaccharid von P. simplex DSM 20130 wurde unter Einwirkung von heißem Formamid (1.3.1.) vom Murein abgespalten. Eine qualitative und quantitative Gegenüberstellung des gegen Aqua bidest. dialysierten Formamidextrakts und der unbehandelten ZWtrp zeigt Tabelle 22. Alle in den Zellwänden nachgewiesenen Komponenten konnten mit Ausnahme der Bestandteile des Mureins in vergleichbaren Verhältnissen im Formamidextrakt bestimmt werden.

Tabelle 22: Chemische Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide von P.simplex DSM 20130 und P.simplex NCIB 9770

Organismus/Herkunft	Identifizierte akzessorische ZW-komponenten	Beschriebene akzessorische ZW-komponenten
P.simplex DSM 20130	Glycerin, Ribit Rhamnose, Galaktose Glucosamin, Phosphat, Sulfat	Galaktose ¹
P.simplex NCIB 9770	Glycerin, Mannose Galaktose, Glucosamin, Phosphat, Sulfat	Galaktose, Mannose ¹ ; Glycerin, Mannose, Galaktose, Glucosamin, Phosphat ²

Referenzen: 1, Keddie und Cure (1977); 2, Fiedler (unveröffentlicht).

Tabelle 23: Quantitative Zusammensetzung des akzessorischen Zellwandpolysaccharids der ZWtrp und des Formamidextrakts von P.simplex DSM 20130

Komponenten	$\mu\text{mol/mg}$ ZWtrp	Formamidextrakt	
		$\mu\text{mol/mg}$ ZWtrp	Mol-Verhältnis
Sulfat (SO_4^{2-})	0.73 [*] (0.80) ^{**}	0.80 ^{**}	=1.00
Phosphat (P_i)	0.45	0.50	0.62
Glucosamin	0.66	0.20	0.25
Galaktose	0.29	0.43	0.54
Rhamnose	0.13	0.22	0.27
Glycerin	0.13	0.21	0.26
Ribit	0.07	0.14	0.17

^{*}, Rhodizonat-Methode; ^{**}, Benzidin-Methode; alle übrigen Werte wurden nach Hydrolyse gaschromatographisch oder enzymatisch ermittelt, Phosphat wurde colorimetrisch bestimmt.

5.4. Chromatographische Untersuchungen des Formamidextrakts

Da der Formamidextrakt von P.simplex DSM 20130 die für bestimmte Teichonsäuren charakteristischen Bestandteile Glycerin, Ribit und Phosphat enthielt, bestand die Möglichkeit, daß P.simplex außer einer Teichonsäure noch ein sulfathaltiges Polysaccharid in seiner Zellwand besaß. Andererseits war ein Zellwandpolysaccharid, das sowohl Sulfat- als auch Phosphoestergruppen in einem Polymeren hatte, nicht auszuschließen. Ein ähnliches Polysaccharid ist von Inoue et al. (1982) für einen nicht weiter definierten Arthrobacter-Stamm beschrieben worden. Zur Klärung dieser Frage wurden mit dem dialysierten Formamidextrakt verschiedene chromatographische Untersuchungen durchgeführt, nämlich Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Dünnschicht-Chromatographie und Dünnschicht-Elektrophorese.

5.4.1. Chromatographie an DEAE-Sephacel

Der Formamidextrakt, der vollständig an die DEAE-Sephacel Säule gebunden hatte, wurde bei einem NaCl-Gehalt von 1.3M von der Säule eluiert (Abbildung 19). Im Vergleich zu Teichonsäuren (Abbildung 18) hatte dieses Polysaccharid eine deutlich höhere Affinität zu dem Anionenaustauscher. Da zur Ermittlung des Elutionsprofils die Phenol-Schwefelsäure-Methode herangezogen wurde, diese aber nur Neutralzucker erfaßte, wurde von jeder zweiten Fraktion ein Aliquot entnommen und gaschromatographisch untersucht. Die Analysen zeigten, daß die Komponenten des Zellwandpolysaccharids in einem Gipfel eluiert wurden. Diese einheitliche Elution der Probe und die große Affinität des Formamidextrakts zu dem Anionenaustauscher ließen sich nur so deuten, daß das Polysaccharid offenbar aus einem Polymeren besteht.

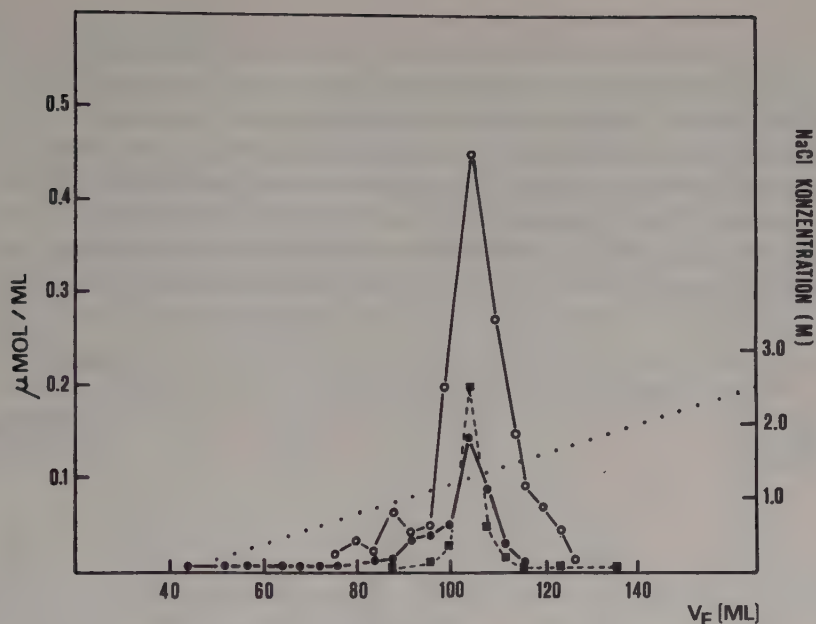


Abbildung 19: Chromatographie des Formamidextrakts von P. simplex DSM 20130 an DEAE-Sephacel

Die Probe wurde auf eine 15.0x1.7cm DEAE-Sephacel Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 0.01M Tris/HCl, pH 7.0, gewaschen. Die Probe wurde mit einem linearen NaCl Gradienten eluiert (.....). Fraktionen von 2ml (6min) wurden gesammelt. Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurde der Phosphat- (●—●—●) und der Neutralzucker-Gehalt (○—○—○) im Vergleich zu einem mitgeführten Phosphat- bzw. Galaktose-Standard gemessen. In einem Aliquot jeder vierten Fraktion wurde nach Hydrolyse Sulfat (■---■---■) mit der Benzidin-Methode ermittelt.

5.4.2. Gelfiltration mit Sephacryl S-300 sf

Das ermittelte Elutionsprofil des Formamidextrakts (Abbildung 20) war durch einen relativ breiten Elutionsvolumen-Bereich ausgezeichnet. Eine gaschromatographische Untersuchung jeder

Fraktion des an- und absteigenden Gipfels ergab, daß alle Zucker- und Zuckeralkoholkomponenten im gleichen Verhältnis wie in der applizierten Probe in den Fraktionen enthalten waren. Deshalb ist der relativ große Elutionsvolumen-Bereich nicht auf eine heterogene Zusammensetzung zurückzuführen, sondern beruht möglicherweise auf unterschiedlichen Kettenlängen eines Zellwandpolysaccharids. Der Stokesche Radius des Polysaccharids war größer als der des Dextrans T10 (MG 10000).

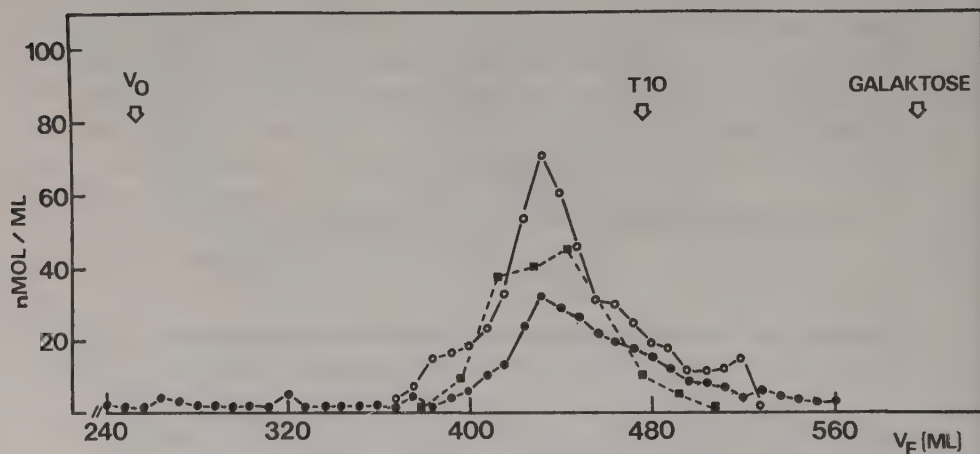


Abbildung 20: Gelfiltration des Formamidextrakts von P. simplex DSM 20130 mit Sephacryl S-300

Die Probe wurde auf eine 145.0x2.5cm Sephacryl S-300 Säule aufgetragen und mit 0.1M Ammoniumacetat, pH 6.9, eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 4ml (10min). Von einem Aliquot jeder zweiten Fraktion wurden der Phosphat-Gehalt (●—●—●) und die Neutralzucker (○—○—○) im Vergleich zu einem Galaktose-Standard nach der Phenol-Schwefelsäure-Methode ermittelt. In jeder vierten Fraktion wurde nach Hydrolyse Sulfat (■---■---■) mit der Benzidin-Methode bestimmt. Zum Vergleich des Stokeschen Radius wurde die Säule mit Dextran T10 (MG 10000) und Galaktose geeicht. Das Ausschlußvolumen (v_0) der Säule wurde mit Dextranblau (MG 2×10^6) ermittelt.

5.4.3. Dünnschicht-Chromatographie des Formamidextrakts

Die aufsteigende Dünnschicht-Chromatographie des Formamidextrakts wurde nach Inoue et al. (1982) auf Kieselgel-Glasplatten mit einem Fließmittel aus 1-Propanol/Ammoniak/Aqua bidest. (40/60/5) und Einfach-Entwicklung durchgeführt. Als Vergleichssubstanz wurde Heparin (Serva) cochromatographiert. Zur Sichtbarmachung der Proben wurde eine Hälfte der Platte mit Phenol-Schwefelsäure-Sprühreagenz behandelt. Der Formamidextrakt von P.simplex DSM 20130 ergab einen R_F -Wert von 0.60. Heparin hatte im Vergleich dazu einen R_F -Wert von 0.52 (Abbildung 21,B). Auf der unbesprühten

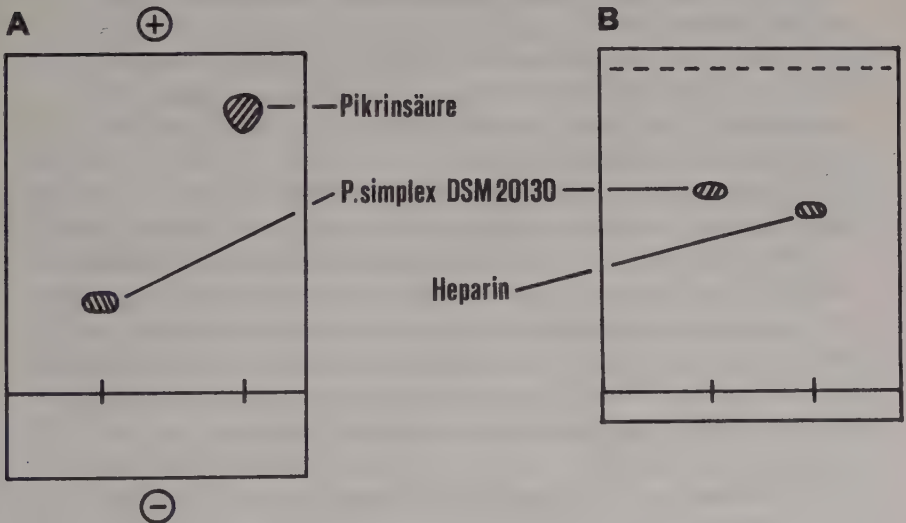


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Kieselgel-Dünnschicht-Elektrophorese (A) und der aufsteigenden Kieselgel-Dünnschicht-Chromatographie (B) des P.simplex DSM 20130 Formamidextrakts

Plattenhälfte, auf der der Formamidextrakt strichförmig aufgetragen wurde, ist nach der Entwicklung des Kieselgel auf der Höhe des detektierten Formamidextrakts von der Glasplatte abgekratzt worden. Die Probe wurde mit Aqua bidest. aus dem Kieselgel eluiert und auf ihre Komponenten untersucht. Es konnten sowohl Sulfat und Phosphat als auch Glycerin, Ribit, Rhamnose, Galaktose und Glucosamin nachgewiesen werden. Auch nach diesem Ergebnis handelt es sich bei dem extrahierten akzessorischen Zellwandpolymer um ein homogenes Polysaccharid.

5.4.4. Dünnschicht-Elektrophorese des Formamidextrakts

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Verhalten des Polysaccharids in einer Dünnschicht-Elektrophorese untersucht. Nach Detektion mit Phenol-Schwefelsäure-Sprühareagenz zeigte der Formamidextrakt einen Fleck auf der Kieselgel-Platte, der, bei einer Feldstärke von 30V/cm, 3.5cm vom Auftragspunkt zur Anode hin migriert war. Die im elektrischen Feld gewanderte Probe hatte, bezogen auf Pikrinsäure, einen R_f -Wert von 0.3 (Abbildung 21,A).

Da mit dem Phenol-Schwefelsäure-Sprühareagenz nicht alle Komponenten des Formamidextrakts erfaßt werden konnten, wurde ein Teil der Platte nach sorgfältiger Entfernung des Puffergemisches mit Schwefelsäure-Sprühareagenz besprüht und erhitzt, um eine Verkohlung des Formamidextrakts zu erreichen. Auch bei dieser Detektions-Methode erschien nach der Elektrophorese nur ein Fleck, was ebenso das Vorliegen eines komplexen, negativ geladenen Polysaccharids bewies.

5.5. Inkubation des Formamidextrakts mit alkalischer Phosphatase

Eine Inkubation des Polysaccharids mit alkalischer Phosphatase sollte aufzeigen, ob das im Polysaccharid ermittelte Phosphat als Phosphomonoester oder Phosphodiester vorkommt und damit an der Kettenbildung beteiligt ist.

Alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse endständiger Phosphatgruppen aus einer Vielzahl biologischer und synthetischer Moleküle. Eine Hemmung der alkalischen Phosphatase durch gleichzeitig vorhandene Sulfatester wurde durch Versuche mit Glycerin-3-Phosphat und Heparin ausgeschlossen. Aus dem P.simplex-Polysaccharid konnte durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase 4.5% des vorhandenen Phosphats freigesetzt werden. Der überwiegende Phosphat-Anteil des Polysaccharids befand sich demzufolge nicht in einer Phosphomonoester-Bindung. Der geringe Prozentsatz an Phosphomonoestern konnte ebenso durch Kettenbruch des Polysaccharids bei der Formamid-Extraktion, wie es schon die Gelchromatographie des Formamidextrakts vermuten ließ, entstanden sein. Das nachgewiesene Phosphat war als ein integraler, kettenbildender Bestandteil des Polysaccharids anzusehen.

5.6. Säurehydrolyselabilität der Galaktose des Polysaccharids

Eine Untersuchung der Säurehydrolyselabilität der Galaktose war nur mit 0.01M HCl (100°C, 1h) möglich, da HF die im Polysaccharid vorkommenden Phosphodiester-Bindungen hydrolysiert und es somit zu einer Fehlinterpretation des Versuchsergebnisses gekommen wäre.

Durch milde Hydrolyse mit 0.01M HCl bei 100°C für 1h wurden 43% der Galaktose des Polysaccharids als monomere Galaktose freigesetzt.

Die damit angezeigte hydrolyselabile Bindung der Galaktose innerhalb des Polysaccharids kann zwei Ursachen haben: Die Galaktose kommt wie bei den in Teil 1 und 2 untersuchten Arthrobacter-Stämmen zumindest teilweise als Gal_f vor, oder die Galaktose ist als Gal_p esterartig mit ihrem C₁-Kohlenstoffatom an Phosphat gebunden, so daß es zu einer Spaltung dieser hydrolyselabilen Bindung kommt.

Nimmt man letztere Möglichkeit an und berücksichtigt, daß 43% der im Polysaccharid vorkommenden Galaktose nach Hydrolyse mit 0.01M HCl als Galaktose, d.h. ohne irgendeinen

Substituenten, nachweisbar waren, so muß nahezu die Hälfte der vorkommenden Galaktose terminal an Seitenketten oder als Substituent einer Kette, mit ihrer reduzierenden Gruppe an Phosphat gebunden, im Polysaccharid vorliegen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen hat P.simplex DSM 20130 ein akzessorisches Zellwandpolymer, das sich von allen bisher bekannten Zellwandpolysacchariden unterscheidet. P.simplex DSM 20130 hat zwar mit Glycerin, Ribit und Phosphat charakteristische Bestandteile für bestimmte Teichonsäuren in seinem Polysaccharid, unterscheidet sich aber ebenso wie das von Inoue et al. (1982) beschriebene Zellwandlysate eines Arthrobacter-Stammes durch das gleichzeitige Vorhandensein von Sulfatestergruppen von den bisher bekannten Zellwandpolysacchariden Gram-positiver Bakterien.

P.simplex NCIB 9770 besitzt ebenfalls Sulfat und Phosphat in seinem Zellwandpolysaccharid, differiert aber in der Zuckerzusammensetzung von P.simplex DSM 20130.

Weitere Untersuchungen zur Klärung der Struktur wurden nicht durchgeführt.

IV. DISKUSSION

Die dargestellten Ergebnisse sollen unter den Gesichtspunkten diskutiert werden:

1. ob die Resultate der chemischen Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolymere mit der Klassifizierung coryneformer Bakterien auf Grund genetischer Daten, der Murein- und der Lipidzusammensetzung korrelieren und zur taxonomischen Beurteilung herangezogen werden können;
2. ob eine strukturelle Gemeinsamkeit der Zellwandpolysaccharide innerhalb von Verwandtschaftsgruppen von coryneformen Bakterien besteht;
3. ob das Vorliegen von Galaktose als Galaktofuranose bei Gram-positiven Bakterien weiter verbreitet ist.

Die Diskussion der akzessorischen Zellwandpolymere ist nach der Murein-Primärstruktur, die für die Einteilung der coryneformen Bakterien von Bedeutung ist, bzw. den Gattungen der untersuchten Bakterien gegliedert.

A.aurescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans, C.ilicis und B.insectiphilum gehören innerhalb der coryneformen Bakterien demselben Mureintyp an (Lys-Ala-Thr-Ala; Fiedler et al., 1973). Gleichzeitig besitzen diese Stämme als gemeinsames Merkmal ein Galaktose enthaltendes Polysaccharid in ihren Zellwänden. Der Phosphat-Gehalt der untersuchten Zellwände war sehr gering (0.6 - 0.9%). Dadurch scheiden Teichonsäuren als akzessorische Zellwandkomponenten aus. Andererseits kann dieser geringe Phosphat-Anteil der Zellwände bei der Anbindung der Polysaccharide ans Murein eine Rolle spielen.

Wie die Extraktionsversuche zur Gewinnung der Polysaccharide

gezeigt haben, sind die Galaktane sowohl durch HF und Alkali als auch unter Einwirkung schwacher Säure vom Murein abtrennbar. Besonders die Wirkung von HF und Natronlauge lassen auf eine Verknüpfung der Polysaccharide über Phosphodiester-Bindungen an das Murein schließen.

Am Beispiel des Galaktans wurde deutlich, daß sich höchstwahrscheinlich am reduzierenden Ende der Polysaccharidkette ein N-Acetyl-Aminozucker (GalNAc oder ManNAc) befindet. Eine derartige Anbindung eines Polysaccharids mit seinem reduzierenden Kettenende über einen N-Acetyl-Aminozucker-C₁-Phosphodiester an das Murein ist bei einigen Gram-positiven Bakterien bereits nachgewiesen worden (Knox und Hall, 1965; Diaz-Maurino und Perkins, 1974; Hughes 1970; Inoue und Kadoya, 1983). Bei den übrigen untersuchten Organismen, die der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter angehören, liegen Hinweise vor, daß die Polysaccharide in gleicher Weise an das Murein gebunden sind.

Zur Gewinnung der Polysaccharide hat sich die Extraktion mit Formamid als sehr günstig herausgestellt. Bei einer einmaligen Formamidbehandlung der Zellwände konnten etwa 10% der vorhandenen akzessorischen Zuckerkomponenten extrahiert werden. Dieser Wert entspricht demjenigen, den Perkins (1965) bei der Extraktion des Polysaccharids von Corynebacterium tritici ermittelt hat.

Vorbedingung für die Extraktion ist eine von Membran- und Proteinresten gereinigte Zellwand. Aus diesem Grund wurden die tryptisch gereinigten Zellwände noch in einer 4% SDS Lösung zur Entfernung nicht kovalent an die Zellwand gebundener Bestandteile erhitzt.

Nach chemischer und enzymatischer Strukturanalyse der extrahierten Polysaccharide ist in allen fünf Galaktanen Galaktose als Galaktopyranose und Galaktofuranose enthalten. Zum einfachen Nachweis der Gal_f hat sich die Hydrolyse mit 60% HF bei 0°C für 16h erwiesen. Wie die Vergleichsex-

perimente mit Gal_f enthaltenden Polysacchariden (Peptidophosphogalaktomannan von Penicillium charlesii und Galaktomannan aus Aspergillus niger) und aus Gal_p aufgebauten Galaktanen ("Schneckengalaktane") bewiesen haben, eignet sich die Hydrolyse mit HF unter den gewählten Bedingungen wesentlich besser zur schnellen Identifizierung von Gal_f als die Hydrolyse mit 0.01M HCl (100°C, 1h). Ein weiterer Beweis für die Spaltung hydrolyselabiler glykosidischer Bindungen durch HF ist die strukturelle Analyse der durch HF-Hydrolyse erhaltenen Galaktan-Oligosaccharide, da die verbliebenen Bruchstücke nahezu vollständig aus Gal_p aufgebaut waren. Op den Camp et al. (1984) sind bei der Untersuchung der Gal_f enthaltenden Lipoteichonsäure von Bifidobacterium bifidum spp. pennsylvanicum mit HF zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen. Die Autoren verwendeten allerdings eine andere HF-Konzentration und führten keine Vergleichsanalysen durch, so daß sie keine Aussage über die spezifische Wirkung der HF gegenüber hydrolyselabilen glykosidischen Bindungen machen konnten. Auf Grund der HF-Hydrolyselabilität und der Analyse der Partialhydrolysate beträgt das Verhältnis von Gal_f zu Gal_p in den fünf untersuchten Galaktanen coryneformer Bakterien in etwa 1:1. In allen ist ein Bereich enthalten, der aus 5 bis 6 (1→2) glykosidisch gebundenen Gal_p-Einheiten besteht.

Die Verknüpfung der Gal_f- mit den Gal_p-Einheiten scheint beim Galaktan von A. aurescens durch eine C₂-Substitution der Gal_p zu erfolgen.

Eine Verzweigung der Galaktoseketten ist nach den Ergebnissen der Perjodat-Oxidation bei allen fünf Polysacchariden anzunehmen.

Auffallend ist, daß sich die fünf Galaktane bei den chromatographischen als auch bei den chemischen und enzymatischen Strukturanalysen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Nur das Polysaccharid von C. ilicis differierte durch das zusätzliche Vorhandensein von Glucosamin neben Galaktose von denen der übrigen vier Stämme. Der Galaktose enthaltende

Teil dieses Galaktans erwies sich als strukturell identisch mit den anderen.

Damit stimmen A. aurescens, A. ureafaciens, A. histidinolovorans, B. insectiphilum und C. ilicis im Aufbau ihrer Zellwandpolysaccharide ebenso wie in ihrem Mureintyp (Fiedler et al., 1970) überein. In ihrer Lipidzusammensetzung, die als schnell nachweisbarer taxonomischer Marker herangezogen wird, und in ihrem Basengehalt der DNA unterscheiden sich A. aurescens, A. ureafaciens, A. histidinolovorans und C. ilicis nicht signifikant (Minnikin et al., 1978; Yamada und Komagata, 1970). Die DNA/DNA Homologien von A. aurescens, A. histidinolovorans und A. ureafaciens rechtfertigen mit Homologiewerten von 30-55% die Trennung in verschiedene Arten (Stackebrandt und Fiedler, 1979). Gleichzeitig wird aber eine nahe verwandtschaftliche Beziehung von A. aurescens, A. ureafaciens, A. histidinolovorans, C. ilicis und B. insectiphilum neben den Gemeinsamkeiten der Murein-Primärstruktur, der Lipidzusammensetzung und des Basengehalts der DNA durch die strukturellen Ähnlichkeiten der Zellwandpolysaccharide weiter unterstützt.

C. ilicis DSM 20138 gilt nach Jones (1975), Yamada und Komagata (1972), Fiedler et al., (1973) und Keddie und Cure (1977) als ein legitimes Mitglied der Gattung Arthrobacter und sollte auch auf Grund der Zusammensetzung und der Struktur seines akzessorischen Zellwandpolysaccharids in diese Gattung überführt werden. Ebenso verhält es sich mit B. insectiphilum ATCC 21686, einem Patentstamm; auch er sollte nach den Ergebnissen der Murein- und Zellwandpolysaccharidzusammensetzung in die Gattung Arthrobacter aufgenommen werden.

A. oxydans DSM 20119, A. oxydans DSM 20120, A. polychromogenes, C. murisepticum und Arthrobacter sp. DSM 20125 weisen übereinstimmend den Mureintyp Lys-Ser-Thr-Ala auf (Fiedler et al., 1973). A. globiformis DSM 20124, ein Vertreter des Mureintyps Lys-Ala₃ (Fiedler et al., 1970), wurde in die Untersuchung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide mit-

aufgenommen, da A.aureescens, A.histidinolovorans, A.urea-faciens, C.ilicis, A.oxydans und A.polychromogenes nach Keddie und Cure (1977) dem idealen Phänotyp der Typspezies A.globiformis DSM 20124 sehr nahe kommen und deshalb als legitimierte Vertreter der Gattung Arthrobacter angesehen werden. Ihre Zellwandpolysaccharide enthalten ebenso Galaktose, jedoch besteht in der Zusammensetzung der übrigen Zucker und Aminosucker Variabilität (Tabelle 10).

Die extrahierten Polysaccharide waren aus glykosidisch gebundenen Zucker und Aminosucker aufgebaut. Anorganische Komponenten wie Sulfat konnten überhaupt nicht, Phosphat in keinem nennenswerten Umfang nachgewiesen werden. Allen untersuchten Zellwandpolysacchariden war auf Grund der Säurehydrolyselabilität und der Perjodat-Oxidationen die zumindest teilweise glykosidische Bindung der Galaktose als Gal_f gemeinsam. Die Säurehydrolyselabilität der Galaktose war in den fünf Polysacchariden höher als in den Galaktanen von A.aureescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans, B.insectiphilum und C.ilicis. Dies kann neben einem unterschiedlichen Anteil an Gal_f und Gal_p noch andere Ursachen haben. Bei A.oxydans DSM 20119, A.oxydans DSM 20120 und C.murisepticum kann es an einer exponierten Stellung der Gal_f am Kettenende oder an Seitenketten der Polysaccharide begründet sein, da Galaktose in diesen Fällen nur einen kleinen Teil der Polysaccharide ausmacht. Da beim Test auf Säurehydrolyselabilität nur die freigesetzte monomere Galaktose und keine Di-, Tri- oder Oligosaccharide bestimmt wurden, spielt die strukturelle Anordnung der Gal_f oder ein mögliches Vorliegen von Gal_f als Substituent bei der Abschätzung des Gal_f-Anteils sicher eine Rolle. Aus diesen Gründen konnte auch nicht aus den Spaltprodukten des Smith-Abbaus auf die glykosidische Bindung der Gal_f bei den drei Polysacchariden geschlossen werden. Festzustellen ist aber, daß die Polysaccharide von A.oxydans und C.murisepticum Gal_f enthalten und außerdem sich in der glykosidischen (1→4) Bindung der Glucose sowie im Verhalten der 6-Desoxy-Talose und

des Glucosamins gegenüber Natriumperjodat sehr ähnlich sind. C.murisepticum ist damit auf Grund seiner Murein-Primärstruktur sowie der Zusammensetzung und des Aufbaus seines akzessorischen Zellwandpolysaccharids ein typischer Vertreter der Gattung Arthrobacter.

Bei A.polychromogenes, der als einziger untersuchter Stamm mit diesem Mureintyp Galaktose als alleinige Polysaccharidkomponente besitzt, ist Gal_f , im Gegensatz zum Galaktan von A.aurescens, überwiegend $(1 \rightarrow 2)$ oder $(1 \rightarrow 3)$ gebunden. Dies ist offenbar neben dem unterschiedlichen Mureintyp ein weiterer Hinweis auf den eigenständigen Status der beiden Arthrobacter Spezies, der auch durch die geringe DNA/DNA Homologie von 21% unterstützt wird (Stackebrandt und Fiedler, 1979).

Dies verdeutlicht außerdem, daß bei der Heranziehung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide als taxonomisches Merkmal nicht nur die chemische Zusammensetzung des Polysaccharids, sondern neben der Konfiguration auch die glykosidische Bindung und damit die Konformation der Zucker entscheidend ist.

Ebenfalls $(1 \rightarrow 2)$ oder $(1 \rightarrow 3)$ ist Gal_f in dem Zellwandpolysaccharid von Arthrobacter sp. DSM 20125 verknüpft.

A.globiformis DSM 20124 besitzt wie die übrigen untersuchten coryneformen Bakterien, die seinem Phänotyp entsprechen, ein neutrales, aus glykosidisch gebundenen Zuckern aufgebautes Zellwandpolysaccharid, das neben Glucose ebenfalls Gal_f enthält.

Die DNA/rRNA Homologie von A.globiformis DSM 20124 zu A.oxydans DSM 20119, Arthrobacter sp. DSM 20125, A.histidinolovorans und A.ureafaciens gibt mit Homologiewerten von 81-88% besser als die DNA/DNA Homologie wieder, daß die untersuchten coryneformen Bakterien zu einer Verwandtschaftsgruppe zählen (Fiedler et al., 1981). Eine Untergliederung dieser coryneformen Bakterien auf Grund des Mureintyps erscheint auch in Hinsicht auf die akzessorischen Zellwandpolysaccharide sinnvoll, wobei A.aurescens, A.ureafaciens, A.histidinolovorans,

B.insectiphilum und C.ilicis durch den Bindungstyp der Gal_f und der Gal_p sowie im Aufbau der Polysaccharide eine sehr einheitliche Gruppe bilden.

Die Untersuchung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide hat weiterhin gezeigt, daß die "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter auf solche coryneformen Bakterien beschränkt bleiben sollte,

- die ein Murein der Gruppe A mit L-Lysin als Diaminosäure und ein aus glykosidisch gebundenen Zucker und/oder Aminozucker und Galaktofuranose aufgebautes Polysaccharid in ihren Zellwänden besitzen;
- denen Mycolsäuren fehlen;
- die in der Lipidzusammensetzung und dem G+C-Gehalt der DNA, den in Tabelle 24 aufgeführten Daten entsprechen.

Diese Forderungen unterstützen auch die Trennung der heterogen zusammengesetzten Gattung Arthrobacter in die "globiformis Gruppe" und die "nicotianae Gruppe", die auf Grund genetischer Untersuchungen gebildet wurde (Stackebrandt und Fiedler, 1979; Stackebrandt et al., 1983). Vertreter dieser "nicotianae Gruppe" besitzen nach Untersuchungen von Fiedler und Schäffler, (1987) Teichonsäuren und unterscheiden sich damit neben dem etwas höheren Basengehalt der DNA auch im Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere von der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter (Tabelle 24).

Die Gattung Pimelobacter wurde von Suzuki und Komagata (1983) neu vorgeschlagen. Sie umfaßt drei Arten, P.simplex und P.tumescens, die vorher als "A.simplex" und "A.tumescens" bezeichnet wurden, sowie P.jensenii. P.simplex unterscheidet sich sowohl in seiner Murein-Primärstruktur mit L,L-Diaminopimelinsäure als Diaminosäure, in seinem Basengehalt der DNA (Fiedler et al., 1970, 1981), in seinen Lipidkomponenten (Suzuki und Komagata 1983) als auch in der chemischen Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolymere von der "globiformis Gruppe" und der "nicotianae Gruppe" der Gattung Arthrobacter. P.simplex DSM 20130 besitzt

Sulfat und Phosphat als anorganische Komponenten in seiner Zellwand. Wie die Formamidextraktion gezeigt hat, sind sowohl Sulfat als auch Phosphat neben Glycerin, Ribit, Rhamnose, Galaktose und Glucosamin akzessorische Bestandteile der Zellwand. Bemerkenswert ist, daß der Formamidextrakt mit Glycerin, Ribit und Phosphat charakteristische Komponenten einer Teichonsäure beinhaltet. Aus diesem Grund war nachzuprüfen, ob nicht zwei unterschiedlich aufgebaute akzessorische Zellwandpolymere in der Zellwand vorhanden sind. Da jedoch durch Flüssigchromatographie und durch Elektrophorese keine Trennung des Formamidextrakts in verschiedene Polymere möglich war, ist von einem einheitlichen Zellwandpolysaccharid bei P.simplex DSM 20130 auszugehen, dessen Struktur nicht näher untersucht wurde.

P.simplex NCIB 9770 hat ebenfalls Sulfat und Phosphat in seiner Zellwand, unterscheidet sich aber in der Zuckerzusammensetzung der Zellwand von P.simplex DSM 20130 (Tabelle 22). Dabei stellt sich die Frage, ob nicht noch weitere P.simplex Stämme Sulfat und Phosphat in ihren akzessorischen Zellwandpolysacchariden besitzen bzw., ob ein Sulfat und Phosphat enthaltendes Zellwandpolysaccharid auf die Spezies P.simplex beschränkt ist?

Mit Ausnahme des von Inoue et al. (1982) beschriebenen Mureinlysats eines Arthrobacter-Stammes ist bei keinem Gram-positiven Bakterium Sulfat als Zellwandkomponente ermittelt worden. Nur bei Archaeobakterien ist in dem Zellwand-Heteropolysaccharid von Halococcus morrhuae und in dem Zellwand-Glykoprotein von Halobakterien Sulfat nachgewiesen worden (Steber, 1976; Wieland et al., 1982). Dabei dürfte es sich bei dem von Inoue et al. (1982) beschriebenen Arthrobacter-Stamm, dessen Mureinlysat Antithrombin Aktivität aufweist, nach den angegebenen und bestimmten Aminosäuren der Zellwand ebenfalls um einen P.simplex Stamm handeln.

Rothia dentocariosa NCTC 10207 ("Nocardia salivae"; Typstamm) und Rothia dentocariosa NCTC 10917 haben ein akzessorisches

Zellwandpolysaccharid, das bei beiden Stämmen aus Galaktose und einem Aminosucker besteht. Galaktose ist auch von Georg und Brown (1967), die die Gattung Rothia aus ehemals als "Actinomyces dentocariosus", "Nocardia dentocariosus" und "Nocardia salivae" beschriebenen Organismen neu zusammenfaßten, als Zellwandzucker beschrieben worden.

Dagegen fordert Hammond (1970 a) auf Grund einer chemischen und serologischen Untersuchung von R.dentocariosa ATCC 17933 und einigen weiteren, aus dem Mundraum isolierten, R.dentocariosa Stämmen Fructose als charakteristischen Zellwandzucker für die Gattung Rothia. Fructose konnte allerdings weder bei R.dentocariosa NCTC 10207 noch bei R.dentocariosa NCTC 10917 nachgewiesen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Gattung Rothia nur aus einer Art nämlich R.dentocariosa besteht, gleichzeitig aber aus einer Vielzahl aus dem Mundraum isolierter Organismen mit unterschiedlichem Erscheinungsbild gebildet wird. Auf Grund der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der löslichen Proteine einiger R.dentocariosa Stämme haben Fotos et al. (1984) die Gattung in drei Gruppen eingeteilt. Dieser uneinheitliche Charakter der Gattung kann auch für eine Variabilität in der Zusammensetzung der akzessorischen Zellwandpolysaccharide verantwortlich sein. In den beiden extrahierten Zellwandpolysacchariden ist auf Grund der Spaltprodukte des Smith-Abbaus, der Perjodat-Oxidation und der Säurehydrolyselabilität der Polysaccharide Gal_f ermittelt worden, wobei die Galaktose des Polysaccharids von R.dentocariosa NCTC 10917 wahrscheinlich ausschließlich als Gal_f vorliegt, da sie ähnlich dem Peptidophosphogalaktomannan durch HF-Hydrolyse vollständig in monomere Galaktose gespalten wurde. Durch den glykosidischen Aufbau und das Vorkommen von Gal_f ähneln die beiden akzessorischen Zellwandpolysaccharide von R.dentocariosa jenen der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter.

Auffallend ist weiterhin, daß die untersuchten akzessorischen Zellwandpolysaccharide der "globiformis Gruppe", von R.dentocariosa und von P.simplex DSM 20130 sich in ihren Stokeschen

Radien bei der Gelchromatographie sehr ähnlich sind. Bezogen auf das Dextran T10 (MG 10000) schwankt das Molekulargewicht der untersuchten extrahierten Polysaccharide zwischen 13000 und 22000. Ein Molekulargewicht von etwa 10000, im Vergleich zu Dextran T10, geben auch Fiedler und Draxl (1986) für das extrahierte akzessorische Zellwandpolysaccharid von Renibacterium salmoninarum an.

Die Gattung Rothia wurde bisher hauptsächlich wegen ihres morphologischen Erscheinungsbilds der Familie Actinomycetaceae zugerechnet (Slack, 1974). Schleifer und Kandler (1972) haben auf Grund des Mureintyps (Lys-Ala₃) der Gattung Rothia, der bei Mitgliedern der Actinomyceten nicht gefunden wurde, eine eigenständige Stellung der Gattung Rothia vorgeschlagen, wobei die Verwandtschaft zu anderen Gram-positiven Bakterien zu prüfen sei.

Die Analyse und der Vergleich der Lipidzusammensetzung von R.dentocariosa NCTC 10917, R.dentocariosa NCTC 10207 und anderen Stämmen dieser Gattung deuten auf eine selbständige taxonomische Gruppe hin; lassen aber keine Einordnung der Gattung Rothia in die Familie Actinomycetaceae zu (Collins und Shah, 1984). Nach Collins und Shah (1984) zeigen die Daten der Lipidzusammensetzung von R.dentocariosa eine mögliche Verwandtschaft zu den coryneformen Bakterien auf. Innerhalb der coryneformen Bakterien besteht auf Grund des hohen G+C-Gehalts der DNA, der Murein- und der Lipidzusammensetzung (Tabelle 24) eine Beziehung zwischen der Gattung Rothia und der "nicotianae Gruppe" der Gattung Arthrobacter (Collins und Shah, 1984). Dieser vorgeschlagenen Verwandtschaft stehen allerdings neben dem unterschiedlichen Mureintyp (Stackebrandt und Fiedler, 1979) auch verschiedene akzessorische Zellwandpolymere gegenüber. R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 besitzen ein Galaktofuranose enthaltendes Zellwandpolysaccharid, wohingegen A.nicotianae ATCC 15236 (Typstamm) und die übrigen Vertreter der "nicotianae Gruppe" Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere haben (Fiedler und Schäffler, 1987). Trotz des gleichen Basenge-

halts der DNA von R.dentocariosa und der "nicotianae" Gruppe der Gattung Arthrobacter sollte sich eine engere Verwandtschaft der Bakterien, wie die bisherigen Untersuchungen bei coryneformen Bakterien gezeigt haben, auch in einem gleichartig aufgebautem akzessorischem Zellwandpolymer ausdrücken.

Das Murein von B.casei NCDO 2048 und B.epidermidis NCDO 2286 enthält meso-Diaminopimelinsäure als Diaminosäure (Collins et al., 1983). Die quantitative Analyse der hydrolysierten Zellwände von B.casei und B.epidermidis läßt auf einen meso-Dpm enthaltenden, direkt quervernetzten Mureintyp schließen. Damit liegt der Zellwand von B.casei und B.epidermidis der gleiche Mureintyp wie B.linens und B.iodinum zu Grunde (Fiedler et al., 1970; Schleifer und Kandler, 1972; Collins et al., 1980).

Durch das Fehlen von Mycolsäuren (Collins et al., 1983) und von Arabinogalaktan unterscheiden sich B.casei und B.epidermidis ebenso wie B.linens und B.iodinum von anderen meso-Dpm enthaltenden coryneformen Bakterien. Für B.linens und damit verwandte Stämme sowie für B.iodinum sind Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere nachgewiesen worden (Fiedler et al., 1981; Anderton und Wilkinson, 1980).

Die quantitative Analyse des HF-Hydrolysats der Zellwände von B.casei und B.epidermidis machte deutlich, daß die Zuckeralkoholkomponenten Glycerin und Mannit über Phosphodiester gebunden sind, B.casei und B.epidermidis also ebenfalls Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere besitzen. Beide Brevibakterien weisen Teichonsäuren des Poly-(Glycerinphosphat)-Typs (Baddiley, 1970), die teilweise glykosidisch substituiert sind, in ihren Zellwänden auf. Auf Grund des Nachweises von Mannit nach HF-Hydrolyse und der unterschiedlichen Affinität zweier verschiedenartig aufgebauter Polyolphosphat-Polymere zu einem Anionenaustauscher hat B.epidermidis neben einer Glycerin-Teichonsäure noch eine Teichonsäure des Poly-(Mannitphosphat)-Typs (Anderton und Wilkinson, 1980; Fiedler et al., 1981) in seinen Zellwänden.

Das gleichzeitige Vorkommen zweier unterschiedlicher Poly-(Polyolphosphat)-Ketten in den Zellwänden eines Organismus haben Fiedler et al. (1981) schon bei einigen B.linens verwandten Stämmen beschrieben.

B.casei und B.epidermidis sind von Collins et al. (1983) wegen des 3-4% höheren G+C-Gehalts der DNA und der geringen DNA/DNA Homologie im Vergleich zu B.linens und B.iodinum als zwei neue Arten der Gattung Brevibacterium beschrieben worden.

Die von Yamada und Komagata (1972), Jones (1975), Collins et al. (1980, 1983) und Fiedler et al. (1981) vorgeschlagene Einteilung und neue Definition der Gattung Brevibacterium umfaßt damit vier Arten. Dabei haben Fiedler et al. (1981) die Gram-Färbung, den Basengehalt der DNA, das Vorhandensein von meso-Dpm und Teichonsäuren sowie das Fehlen von Arabinogalaktan und Mycolsäuren in den Zellwänden als taxonomische Marker für die Klassifizierung als Brevibacterium gefordert.

Nach der Untersuchung der akzessorischen Zellwandpolymere und dem Nachweis von Teichonsäuren sind somit für B.casei und B.epidermidis alle Voraussetzung für eine Klassifizierung als Brevibacterium gegeben.

B.linens als Vertreter der Gattung Brevibacterium und A.globiformis DSM 20124 haben eine DNA/rRNA Homologie von 56% (Fiedler et al., 1981). Dieser Wert liegt deutlich unter der DNA/rRNA Homologie von A.globiformis DSM 20124 mit A.histidinolovorans, A.ureafaciens und A.oxydans DSM 20119 (81-88% ; Fiedler et al., 1981), so daß sich die eigenständige Klassifizierung der Gattung Brevibacterium und jener Organismen, die dem Phänotyp das A.globiformis entsprechen, neben den genetischen Daten und dem Mureintyp auch in dem andersartigen Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere ausdrückt.

Galaktofuranose konnte in den Teichonsäuren von B.casei und B.epidermidis nicht identifiziert werden. Die als glykosidisch gebundener Substituent der Poly-(Glycerinphosphat)-Kette

vorliegende Galaktose ist wegen der geringen HF-Hydrolyse-labilität als Pyranose gebunden. Käme die nachgewiesene Galaktose als Gal_f vor, müßte sie bei der HF-Hydrolyse nahezu vollständig freigesetzt werden, was durch den Nachweis von α -Galaktosyl-Glycerin bei beiden Brevibakterien nicht der Fall war.

Die Untersuchungen der akzessorischen Zellwandpolymere und die daraus gewonnenen strukturellen Daten haben verdeutlicht, daß innerhalb einer, auf Grund der Murein- und der Lipidzusammensetzung sowie der genetischen Daten, nah verwandten Gruppe coryneformer Bakterien ein gleichartiger Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere, der aber in der organisch-chemischen Zusammensetzung variieren kann, besteht.

Es konnten bei Mitgliedern der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter keine negativ geladenen Zellwandpolymere nachgewiesen werden, andererseits beschränkt sich die neu definierte Gattung Brevibacterium auf solche Organismen, die über Teichonsäuren als akzessorische Zellwandpolymere verfügen. Bei den "Corynebakterien sensu stricto" hat sich ebenfalls ein Zellwandpolymer - das Arabinogalaktan und das Vorkommen von Mycolsäuren - als taxonomisch relevant erwiesen (Tabelle 24).

Ein weiteres Kriterium für das Heranziehen der akzessorischen Zellwandpolymere als taxonomischer Marker bei den coryneformen Bakterien ist, daß sich während der verschiedenen Phasen des Wachstums, wie die Untersuchungen bei A. aurescens gezeigt haben, keine chemische Änderungen in der Zusammensetzung und dem Aufbau des Zellwandpolysaccharids ergeben haben.

Auf Grund dieser Ergebnisse eignen sich die akzessorischen Zellwandpolymere bei den coryneformen Bakterien als taxonomischer Marker. Die alleinige Angabe eines Zellwandzuckers, wie sie von Keddie und Cure (1977) vorgenommen worden ist, hat allerdings keine Aussagekraft. Schon die biochemische Differenzierung der Galaktose in Galaktopyranose und Galakto-

Tabelle 24: Chemotaxonomische Merkmale coryneformer Bakteriengruppen und der Gattung *Rothia*

Taxonomische Gruppe	Diaminosäure des Mureins	Mol % G+C	Mycolsäuren Fettsäuren	Menachinone	polare Lipide	akzess. ZW.-polymere
Referenz:	1, 2, 5	5, 7, 10, 11, 14	6, 10, 13	8, 9, 10, 11, 12, 14	8, 9, 10, 11, 12, 14	3, 4, 13
"globoformis Gruppe" der <i>Arthrobacter</i>	L-Lys	59-66	-	S, A, I, U MK-9 (H ₂)	DPG, PG, PI, DGDG, DMDG	PS (+Gal _F)
"nicotianae Gruppe" der <i>Arthrobacter</i>	L-Lys	65-69	-	S, A, I, U	DPG, PG, DMDG	TS
<i>Pimelobacter simplex</i>	L, L-Dpm	72-74	-	S, A, I, U, T MK-8 (H ₄)	DPG, PG, OH-PG	PS (+PO ₄ ³⁻ + SO ₄ ²⁻)
<i>Brevibacterium</i>	m-Dpm	60-64	-	S, A, I	DPG, PG, DMDG	TS
" <i>Corynebacterium</i> <i>sensu stricto</i> "	m-Dpm	51-59	+	S, U MK-8 (H ₂) MK-9 (H ₂)	DPG, PI, PIDM	PS (Gal+Ara)
<i>Rothia</i>	L-Lys	65-69	-	S, A, I MK-6, MK-7	DPG, PG, DMDG	PS (+Gal _F)

Referenzen:

- 1, 2, 3 Fiedler et al., (1970), (1973), (1981)
- 4 Fiedler und Schäffler (1987)
- 5 Yamada und Komagata (1970)
- 6 Schleifer und Kandler (1972)
- 7 Hammond (1970 b)
- 8 Minnikin et al., (1978)
- 9, 10, 11 Collins et al., (1979), (1980), (1983)
- 12 Collins und Shah (1984)
- 13 Keddie und Cure (1972)
- 14 Suzuki und Komagata (1983)

Abkürzungen:

+/-, vorhanden/nicht vorhanden; S, geradkettige Fettsäuren; A, anteiso-Fettsäuren; I, iso-Fettsäuren; U, einfach ungesättigte Fettsäuren; T, Tuberculostearinsäure; PG, Phosphatidylglycerin; DPG, Diphasphatidylglycerin; PI, Phosphatidylinosit; PIDM, Phosphatidyl-inosit-dimannosid; OH-PG, Phosphatidylglycerin mit hydroxylierten Fettsäuren; MGDG, Monogalaktosyl-diacylglycerin; DGDG, Digalaktosyl-diacylglycerin; DMDG, Dimannosyl-diacylglycerin; PS, Polysaccharid; TS, Teichonsäure.

furanose ist sowohl für die bakterielle Biosynthese der Polysaccharide als auch als Zelloberflächenkomponente für die Interaktion der Bakterien mit ihrer Umgebung ausschlaggebend. Wenn man eine Biosynthese der Gal_f wie in Penicillium charlesii und Salmonella typhimurium annimmt, so müssen für ein Gal_f enthaltendes Polysaccharid die nucleotidaktivierten Vorstufen UDP-Glc_p und/oder UDP-Gal_p enzymatisch in mehreren Schritten in UDP-Gal_f umgewandelt werden (Trejo et al., 1971; Sarvas und Nikaido, 1971; Fobes und Gander, 1972).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Von 14 coryneformen Bakterien sowie von R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 wurde die chemische Zusammensetzung und der strukturelle Aufbau der extrahierten akzessorischen Zellwandpolymere bestimmt.

- Die untersuchten Vertreter der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter sowie B.insectiphilum ATCC 21686 und C.murisepticum ATCC 21374 besitzen neutrale Polysaccharide als akzessorische Zellwandpolymere. Ein unterschiedlicher Anteil der in allen Zellwandpolysacchariden vorkommenden Galaktoseeinheiten ist auf Grund des Vergleichs der Säurehydrolyselabilität mit Galaktanen bekannter Struktur als Galaktofuranose (Gal_f) gebunden, wobei die glykosidische Bindung der Gal_f variiert.

A.aurescens DSM 20116, A.histidinolovorans DSM 20115, A.ureafaciens DSM 20126, C.ilicis DSM 20138 und B.insectiphilum ATCC 21686 besitzen Galaktane als Zellwandkomponente, die sich bei den biochemischen Untersuchungen bis auf das zusätzliche Vorkommen von Glucosamin bei C.ilicis nicht unterscheiden.

Das Molekulargewicht der extrahierten Galaktane schwankte bezogen auf die Dextrane T10, T40 und T70 zwischen 13000 und 15000. Perjodat-Oxidation, Analyse der Smith-Abbauprodukte, enzymatische Oxidation und - Hydrolyse der Polysaccharide lieferten zusammen mit den Ergebnissen der Oligosaccharidanalyse den Hinweis auf β -(1 $\rightarrow$ 5) oder β -(1 $\rightarrow$ 6) gebundene Gal_f und (1 $\rightarrow$ 2) gebundene Gal_p als charakteristische Strukturmerkmale der Galaktane.

A.globiformis DSM 20124, A.oxydans DSM 20119, A.oxydans DSM 20120, Arthrobacter sp. DSM 20125 und C.murisepticum ATCC 21374 besitzen komplex zusammengesetzte Polysaccharide als akzessorische Zellwandpolymere mit einem unterschiedlichen Anteil an Gal_f. Das Molekulargewicht der extrahierten Polysaccharide wurde bei der Gelfiltration mit Werten von 18000-22000 ermittelt. A.polychromogenes hat ein Galaktan als Zellwandkomponente, wobei Gal_f (1→2) und/oder (1→3) gebunden ist. Ebenfalls (1→2) und/oder (1→3) ist Gal_f in dem Zellwandpolysaccharid von Arthrobacter sp. DSM 20125 verknüpft.

- Auf Grund verschiedener chromatographischer Trennverfahren konnte aufgezeigt werden, daß P.simplex DSM 20130 ein homogen aufgebautes akzessorisches Zellwandpolymer hat, das neben Galaktose, Glucosamin, Rhamnose, Glycerin und Ribit auch Sulfat und Phosphat als anorganische Bestandteile aufweist.
- B.casei NCDO 2048 und B.epidermidis NCDO 2286 enthalten Teichonsäuren als Zellwandbestandteile. B.casei besitzt eine Teichonsäure des Poly-(Glycerinphosphat)-Typs, wobei die Glycerinphosphatketten teilweise mit Glucose und Galaktose α -glykosidisch substituiert sind. B.epidermidis hat zwei unterschiedlich aufgebaute Teichonsäuren in seinen Zellwänden
 - eine entspricht dem Poly-(Glycerinphosphat)-Typ, ebenfalls teilweise mit Galaktose α -glykosidisch substituiert,
 - die andere dem Poly-(Mannitphosphat)-Typ.
- R.dentocariosa NCTC 10917 und R.dentocariosa NCTC 10207 weisen wie die untersuchten Bakterien der "globiformis Gruppe" der Gattung Arthrobacter homogen aufgebaute Polysaccharide bestehend aus glykosidisch gebundener Gal_f und jeweils einem variierenden Aminosucker in ihren Zellwänden auf.
- Die Daten über die unterschiedliche Zusammensetzung und den Aufbau der akzessorischen Zellwandpolymere werden innerhalb

der Gattungen und der "Gruppe coryneformer Bakterien" mit taxonomischen Kriterien wie der Murein-Primärstruktur, der Lipidzusammensetzung und den genetischen Daten, verglichen und auf ihre Aussagekraft als taxonomisches Merkmal diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Albersheim JW, DJ Nevins, PD English and A Karr (1967): A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res. 5, 340-345
- Ames BN und DT Dubin (1960) : The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 235, 769-771
- Anderton WJ und SG Wilkinson (1980) : Evidence for the presence of a new class of teichoic acid in the cell wall of Bacterium NCTC 9742. J. Gen. Microbiol. 118, 342-351
- Antonopoulos CA (1962) : Modification for the determination of sulphate in mucopolysaccharides by the benzidine method. Acta Chem. Scand. 16, 1521-1522
- Archibald AR, J Baddiley und D Button (1968) : The glycerol teichoic acid of walls of Staphylococcus lactis I3. Biochem. J. 110, 543-557
- Archibald AR, HE Coapes und GH Stafford (1969) : The action of dilute alkali on bacteria cell walls. Biochem. J. 113, 899-900
- Armstrong JJ, J Baddiley, JG Buchanan, B Carrs und GR Greenberg (1958) : Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. J. Chem. Soc. 4344-4354

- Avigad G, D Amarel, C Asensio und BL Horecker (1962) : The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. J. Biol. Chem. 237, 2736-2743
- Baddiley J (1970) : Structure, biosynthesis and function of teichoic acids. Account. Chem. Res. 3, 98-105
- Bardalaye PC und JH Nordin (1977) : Chemical structure of the galactomannan from the cell wall of *Aspergillus niger*. J. Biol. Chem. 252, 2584-2591
- Batavyal L und N Roy (1983) : Structure of the capsular polysaccharide of *Diplococcus pneumoniae* type 31. Carbohydr. Res. 119, 300-302
- Bergmeyer HU (1974) : Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim
- Berst M, O Lüderitz und O Westphal (1971) : Studies on the structure of T1 lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 18, 361-368
- Braun V und K Rehn (1968) : Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E.coli* cell wall. Eur. J. Biochem. 10, 426-438
- Bretting H, NF Whittacker, EA Kabat, K Königsmann-Lange und HJ Thiem (1981) : Chemical and immunochemical studies on the structure of four snail galactans. Carbohydr. Res. 98, 213-236
- Burger MM und L Glaser (1966) : The synthesis of teichoic acids. V. Polyglucosylglycerolphosphate und polygalactosylglycerolphosphate. J. Biol. Chem. 241, 494-506

- Clutterbuck PW, AE Oxford, H Raistrick und G Smith (1932) :
CLXXI. Studies in the biochemistry of micro-organisms.
XXIV. The metabolic products of the *Penicillium brevicompactum* series. *Biochem. J.* 26, 1441-1458
- Collins MD, M Goodfellow und DE Minnikin (1979) : Isoprenoid
quinones in the classification of coryneform and related
bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 110, 127-136
- Collins MD, D Jones, RM Keddle und PHA Sneath (1980) : Re-
classification of *Chromobacterium iodinum* (Davis) in a re-
defined genus *Brevibacterium* (Breed) as *Brevibacterium*
iodinum nom.rev.; comb.nov. *J. Gen. Microbiol.* 120, 1-10
- Collins MD, JAE Farrow, M Goodfellow und DE Minnikin (1983) :
Brevibacterium casei sp.nov. and *Brevibacterium epidermidis*
sp.nov. *System. Appl. Microbiol.* 4, 388-395
- Collins MD und HN Shah (1984) : Fatty acid, menaquinone and
polar lipid composition of *Rothia dentocariosa*. *Arch.*
Microbiol. 137, 247-249
- Cummins CS und H Harris (1959) : Taxonomic position of *Arthro-*
bacter. *Nature* 184, 831-832
- Cummins CS (1962) : Chemical composition and antigenic structure
of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*,
Actinomyces and *Arthrobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 28, 35-50
- De Recondo MEF, BF De Arcuri und EF De Recondo (1981) : A
specific method for D-galactose quantitative determination:
A modification of the D-galactose oxidase assay. *Carbohydr.*
Res. 93, 167-175
- Diaz-Maurino T und HR Perkins (1974) : The presence of acidic
polysaccharides and muramic acid phosphate in the walls of
Corynebacterium poinsettiae and *Corynebacterium betae*.
J. Gen. Microbiol. 80, 533-539

- Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers und F Smith (1956) : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356
- Fiedler F, KH Schleifer, B Cziharz, E Interschick und O Kandler (1970) : Murein types in *Arthrobacter*, *Brevibacteria*, *Corynebacteria* and *Microbacteria*. Publ. Fac. Sci. Univ. J.E. Purkyne Brno 47, 111-122
- Fiedler F, KH Schleifer und O Kandler (1973) : Amino acid sequence of the threonine-containing mureins of coryneform bacteria. J. Bacteriol. 113, 8-17
- Fiedler F, MJ Schäffler und E Stackebrandt (1981) : Biochemical and nucleic acid hybridization studies on *Brevibacterium linens* and related strains. Arch. Microbiol. 129, 85-93
- Fiedler F und R Draxl (1986) : Biochemical and immunochemical properties of the cell surface of *Renibacterium salmoninarum*. J. Bacteriol. 168, 799-804
- Fiedler F und M Schäffler (1987) : Teichoic acids in cell walls of the "nicotianae" group of *Arthrobacter*: A chemotaxonomic marker. Zbl. Bakt. Hyg., im Druck
- Fischer W, HU Koch, P Rösel, F Fiedler und L Schmuck (1980) : Structural requirements of lipoteichoic acid carrier for recognition by the poly(ribitolphosphate)polymerase from *Staphylococcus aureus* H. J. Biol. Chem. 255, 4550-4556
- Fobes WS und JE Gander (1972) : Evidence for uridine 5'-(α -D-galactopyranosyl pyrophosphate):NAD 2 hexosyl oxidoreductase in *Penicillium charlesii*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 76-83
- Forrester IT und AJ Wicken (1966) : A novel teichoic acid-like polymer from the cell walls of *Bacillus coagulans* T 2007. Biochem. Biophys. Res. Com. 25, 23-27

- Fotos PG, MA Gerencser und DB Yelton (1984) : Strain differentiation of *Rothia dentocariosa* and related isolates by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Int. J. System Bacteriol.* 34, 102-106
- Fuller AT (1938) : The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. *Brit. J. exp. Path.* 19, 130-139
- Gander JE, NH Jentoft, LR Drewes und PD Rick (1974) : The 5-0-B-D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. *J. Biol. Chem.* 249, 2063-2072
- Ganfield M-C, W und RA Pieringer (1980) : The biosynthesis of nascent membrane lipoteichoic acid of *Streptococcus faecium* (*S. faecis* ATCC 9790) from phosphatidylkojibiosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 225, 5164-5169
- Gathmann WD und D Aminoff (1981) : Steric factors involved in the action of glycosidases and galactose oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103, 68-76
- Georg LK und JM Brown (1967) : *Rothia* gen. nov. An aerobic genus of the family Actinomycetaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17, 79-88
- Glaser L und MM Burger (1964) : The synthesis of teichoic acids. III. Glucosylation of polyglycerolphosphate. *J. Biol. Chem.* 239, 3187-3191
- Grant WD (1979) : Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 137, 35-43
- Hammond BF (1970 a) : Isolation and serological characterization of a cell wall antigen of *Rothia dentocariosa*. *J. Bacteriol.* 103, 634-640

- Hammond BF (1970 b) : Deoxyribonucleic acid base composition of *Rothia dentocariosa* as determined by thermal denaturation. J. Bacteriol. 104, 1024-1026
- Hammond SM, PA Lambert und AN Rycroft (1984) : The bacterial cell surface. Croom Helm, London, 1-36
- Höltje JV und A Tomasz (1975) : Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72, 1690-1694
- Holleman AF und E Wiberg (1971) : Lehrbuch der anorganischen Chemie, Walter de Gruyter u. Co. Verlag, Berlin, 240f
- Holligan PM und EA Drew (1971) : The routine analysis by gas-liquid chromatography of soluble carbohydrates in extracts of plant tissues. II. Quantitative analysis of standard carbohydrates and the separation and estimation of soluble sugars and polyols from a variety of plant tissues. New Phytol. 70, 271
- Hughes RC (1970) : The cell wall of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C. 6346. Biochem. J. 117, 431-439
- Inoue K, H Korenaga und S Kadoya (1982) : A sulfated polysaccharide produced by an *Arthrobacter* species. J. Biochem. 92, 1775-1784
- Inoue K und S Kadoya (1983) : The sulfated polysaccharide-peptidoglycan complex from an *Arthrobacter* species: Characterization of the linkage between the two components. J. Biochem. 94, 189-197
- Jones D (1975) : A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 87, 52-96

- Joseleau JP, M Lapeyre, M Vignon und GGS Dutton (1978) :
Chemical and n.m.r.-spectroscopic investigation of the
capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K 41.
Carbohydr. Res. 67, 197-212
- Kabat EA und MM Mayer (1971) : *Experimental Immunochemistry*,
second edition, fourth printing, CC Thomas ed., Springfield,
Illinois, 548
- Kaya S, K Yokoyama, Y Araki und E Ito (1984) : N-acetyl-
mannosaminy (1→4) N-acetylglucosamine, a linkage unit
between glycerol teichoic acid and peptidoglycan in cell
walls of several *Bacillus* strains. *J. Bacteriol.* 158,
990-996
- Keddie RM (1974) : Genus *Arthrobacter*, in *Bergey's Manual of
Determinative Bacteriology*, 8th ed., RE Buchanan and NE
Gibbons eds., The Williams and Wilkins Co, Baltimore
- Keddie RM und GL Cure (1977) : The cell wall composition and
distribution of free mycolic acids in named strains of
coryneform bacteria and in isolates from various natural
sources. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 229-252
- Knox KW und EA Hall (1965) : The linkage between the poly-
saccharide and mucopeptide components of the cell wall of
Lactobacillus casei. *Biochem. J.* 96, 302-309
- Krause RM und M Mc Carty (1961) : Studies on the chemical
structure of the streptococcal cell wall. I. The identi-
fication of a mucopeptide in the cell walls of groups A
and A-variant streptococci. *J. exp. Med.* 114, 127-140
- Krause RM und M Mc Carty (1962) : Studies on the chemical
structure of the streptococcal cell wall. II. The composi-
tion of group C cell walls and chemical basis for serologic
specificity of the carbohydrate moiety. *J. exp. Med.* 115,
49-62

- Kusser W und F Fiedler (1983) : Murein type and polysaccharide composition of cell walls from *Renibacterium salmoninarum*. FEMS 20, 391-394
- Kusser W, K Zimmer und F Fiedler (1985) : Characteristics of the binding of aminoglycoside antibiotics to teichoic acids. A potential model system for interaction of aminoglycosides with polyanions. Eur. J. Biochem. 151, 601-605
- Lambert PA, JC Hancock und J Baddiley (1975) : The interaction of magnesium ions with teichoic acids. Biochem. J. 149, 519-524
- Lancefield RC (1941) : Specific relationship of cell composition to biological activity of hemolytic streptococci. Harvey Lect. 36, 251-290
- Lee TH, M Arai und S Murao (1981) : Structure of fucogalactomannan of Red Yeast cell wall. Agric. Biol. Chem. 45, 1301-1309
- Lipkin D, BE Phillips und JW Abrell (1969) : The action of hydrogen fluoride on nucleotides and other esters of phosphorus(V)acids. J. Org. Chem. 34, 1539-1547
- Matsunaga T, A Okubo, M Fukami, S Yamazaki und S Toda (1981) : Identification of β -galactofuranosyl residues and their rapid internal motion in the *Penicillium ochro-chloron* cell wall probed by ^{13}C nmr. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 524-530
- Merck (1970) : Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E Merck, Darmstadt, 84
- Minnikin DE, M Goodfellow und MD Collins (1978) : Lipid composition and identification of coryneform and related taxa, in *Coryneform Bacteria*, IJ Bousfield and AG Calley eds., Academic Press, London, 85-160

- Misaki A, N Seto und I Azuma (1974) : Structure and immunological properties of D-arabino-D-galactan isolated from cell walls of *Mycobacterium* species. *J. Biochem.* 76, 15-27
- Op den Camp HJM, JH Veerkamp, A Oosterhof und H van Halbeek (1984) : Structure of the lipoteichoic acids from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. *Biochem. Biophys. Acta* 795, 301-313
- Perkins HR (1963) : A polymer containing glucose and amino-hexuronic acid isolated from the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem. J.* 86, 475-483
- Perkins HR (1965) : The action of hot formamide on bacterial cell walls. *Biochem. J.* 95, 876-882
- Plackett P und SH Buttery (1964) : A galactofuranose disaccharide from the galactan of *Mycoplasma mycoides*. *Biochem. J.* 90, 201-205
- Powell DA, M Duckworth und J Baddiley (1975) : A membrane-associated lipomannan in micrococci. *Biochem. J.* 151, 387-397
- Preston JF und JE Gander (1968) : Isolation and partial characterization of the extracellular polysaccharides of *Penicillium charlesii*. I. Occurrence of galactofuranose in high molecular weight polymers. *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 504-512
- Preston JF, E Lapis und JE Gander (1970) : Immunological investigation of *Penicillium*. I. Serological reactivities of exocellular polysaccharides produced by six *Penicillium* species. *Canad. J. Microbiol.* 16, 687-694

- Reissig JL, JL Strominger und LF Leloir (1955) : A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 252, 2584-2591
- Rietschel-Berst M, NH Jentoft, PD Rick, C Pletcher, F Fang und JE Gander (1977) : Extracellular exo- β -galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*. *J. Biol. Chem.* 252, 3219-3226
- Rogosa M, LS Cummins, RH Lelliott und RM Keddle (1974) : Coryneform group of bacteria, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., RE Buchanan and NE Gibbons eds., The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 599-632
- Sarvas M und H Nikaido (1971) : Biosynthesis of T1 antigen in *Salmonella*: Origin of D-galactofuranose and D-ribofuranose residues. *J. Bacteriol.* 105, 1063-1072
- Schäffler MJ (1982) : Chemische Untersuchungen an akzessorischen Zellwandpolymeren bei coryneformen Bakterien. Ein Beitrag zur Taxonomie. Dissertation Universität München
- Schleifer KH und O Kandler (1967) : Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I: Zur Aminosäuresequenz des Mureins von *Str.thermophilus* und *Str.faecalis*. *Arch. Microbiol.* 57, 335-365
- Schleifer KH und O Kandler (1972) : Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477
- Scott JE (1965) : Fractination by precipitation with quaternary ammonium salts. *Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. V*, RL Whistler ed., Academic Press, London, 38
- Siegel JL, SF Hurst, ES Liberman, SE Coleman und AS Bleiweis (1981) : Mutanolysin-induced spheroplasts of *Streptococcus mutans* are true protoplasts. *Infect. Immun.* 31, 808-815

Slack JM (1974) : Family Actinomycetaceae, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., RE Buchanan and NE Gibbons eds., The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 659-660

Soltzberg S (1970) : Alditol anhydrides. Advances in Carbohydrate Chemistry 25, 229-283

Stackebrandt E und F Fiedler (1979) : DNA-DNA homology studies among strains of *Arthrobacter* and *Brevibacterium*. Arch. Microbiol. 120, 289-295

Stackebrandt E, VJ Fowler, F Fiedler und H Seiler (1983) : Taxonomic studies on *Arthrobacter nicotianae* and related taxa: Description of *Arthrobacter uratoxydans* sp.nov. and *Arthrobacter sulfureus* sp.nov. and reclassification of *Brevibacterium protophormiae* as *Arthrobacter protophormiae* com.nov.. System. Appl. Microbiol. 4, 470-486

Steber J (1976) : Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung und Struktur der Zellwand von *Halococcus morrhuae*. Dissertation Universität München

Strominger JL und JM Ghuyssen (1963) : Linkage between teichoic acid and glycopeptide in the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 418-424

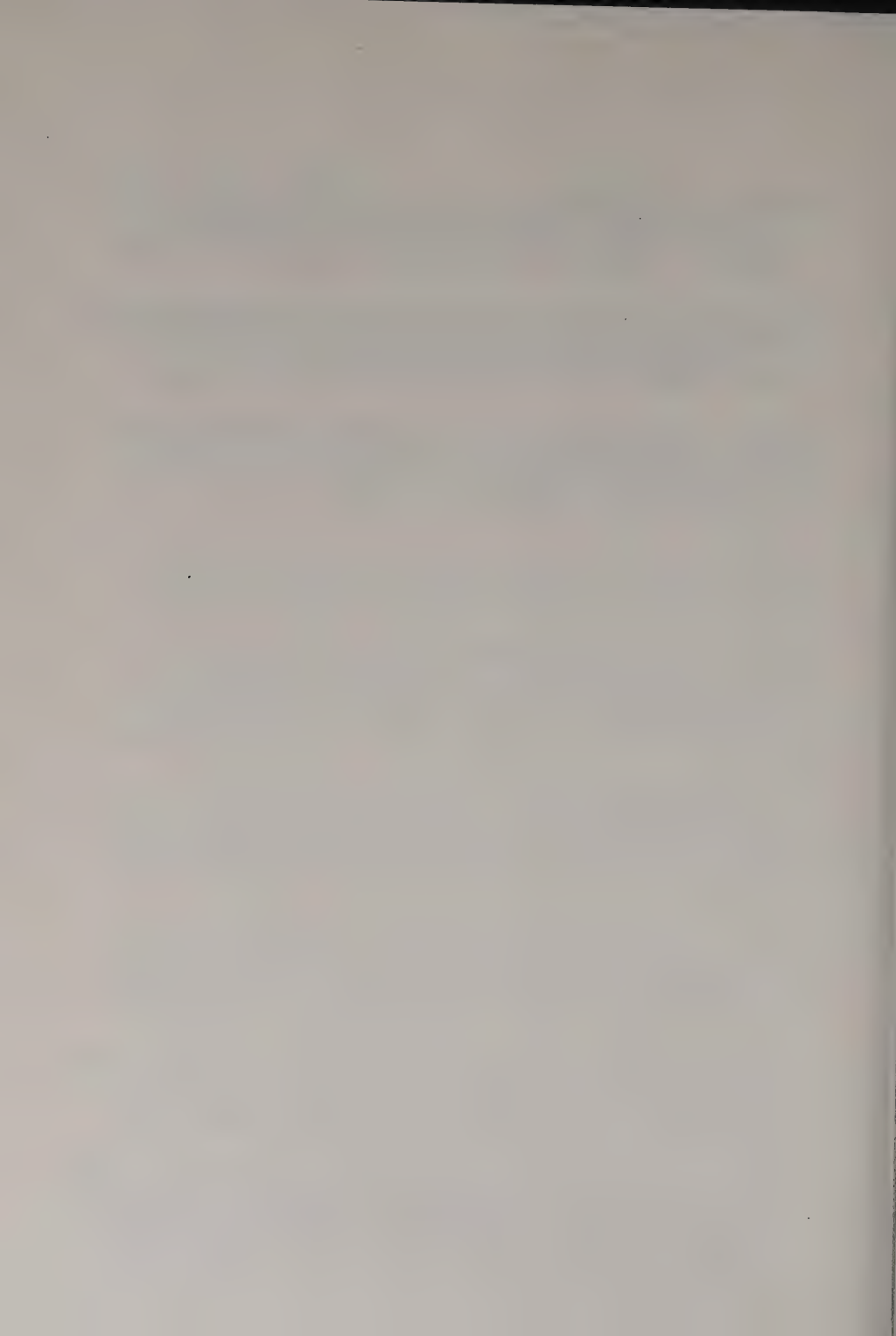
Sugawara I und S Ishizaka (1984) : Polysaccharides with sulfate groups are human T cell mitogens and murine polyclonal B cell activators (PBAs). Microbiol. Immunol. 28, 831-839

Suzuki KI und K Komagata (1983) : *Pimelobacter* gen. nov., a new genus of coryneform bacteria with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. J. Gen. Microbiol. 29, 59-71

Terho TT und K Hartiala (1971) : Method for determination of the sulphate content of glycosaminoglycans. Anal. Biochem. 41, 471-476

- Trejo GA, JW Haddock, GJF Chittenden und J Baddiley (1971) : The biosynthesis of galactofuranosyl residues in galactocarolose. *Biochem. J.* 122, 49-57
- Venkata Rao E, JG Buchanan und J Baddiley (1966) : The type-specific substance from *Pneumococcus* type 10 A (34). *Biochem. J.* 100, 811-815
- Wagner M, B Wagner und M Ryc (1978) : An electron microscopic study of the location of peptidoglycan in group A and C streptococcal cell walls. *J. Gen. Microbiol.* 108, 283-294
- Ward JB (1981) : Teichoic and teichuronic acids: Biosynthesis, assembly and location. *Microbiol. Rev.* 45, 211-243
- Wicken AJ und KW Knox (1970) : Studies of the group F antigen of lactobacilli: Isolation of a teichoic acid-lipid complex from *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991. *J. Gen. Microbiol.* 60, 293-301
- Wieland F, J Lechner und M Sumper (1982) : The cell wall glycoprotein of Halobacteria: Structural, functional and biosynthetic aspects. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 3, 161-170
- Yamada K und K Komagata (1970) : Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16, 215-224
- Yamada K und K Komagata (1972) : Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18, 417-431
- Yamaguchi H, T Ikenaka und Y Matsushima (1970) : An improved method for gas-liquid chromatographic analysis of Smith degradation products from oligosaccharides. *J. Biochem.* 68, 253-254

- Yamaguchi H und T Mukumoto (1977) : GLC analysis of the hydroxy and oxo compounds produced by the Smith degradation of reducing di- and trisaccharides. *J. Biochem.* 82, 1673-1680
- Yamashita K, T Mizuochi und A Kobata (1982) : Oligosaccharides-Gelfiltration Analysis, in *Methods in Enzymology*, V Ginsburg ed., Academic Press, New York, 83, 108f
- Young FE (1967) : Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 58, 2377-2384



Herrn Prof. Dr. F. Fiedler danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, für die vielseitigen Unterstützungen sowie für die wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Für die großzügige Übersendung zweier Galaktane und die Durchführung eines Radioimmunoassays danke ich Herrn Prof. Dr. H. Bretting.

LEBENS LAUF

Am 7. Februar 1951 wurde ich, Peter Nordmann, als Sohn des Kaufmanns Karlfried Nordmann und seiner Frau Ursula Nordmann, geborene Güntel, in Stuttgart geboren.

Dort besuchte ich von März 1957-1961 die Kochenhof-Mühlbachhofschule und von März 1961-März 1963 das Eberhard-Ludwig Gymnasium.

März 1963 wurde ich in das Landerziehungsheim Schondorf am Ammersee eingeschult und legte dort 1971 das Abitur ab.

Oktober 1971 begann ich an der Universität München Chemie (Diplom) zu studieren. Oktober 1975 bekam ich die Zulassung zum Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München, Juni 1979 legte ich dort das Staatsexamen in Lebensmittelchemie ab.

Im Mai 1980 begann ich unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Fiedler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation.

